

Encapsulamento do corante natural de duas espécies de figo-da-índia (*Opuntia stricta* e *Opuntia robusta*)



Sara Marisa Barros de Castro

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador(es): Doutora Maria do Carmo Martins Serrano

Professora Doutora Margarida Gomes Moldão-Martins

Júri

PRESIDENTE: Doutora Maria Luísa Louro Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

VOGAIS: - Doutora Maria Paula Gomes da Conceição Sequeira Esteves, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

- Doutora Maria do Carmo Martins Serrano, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha orientadora, a Doutora Maria do Carmo Martins Serrano, investigadora auxiliar na Unidade de Tecnologia e Inovação do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, o apoio, a orientação, a disponibilidade e o esclarecimento de dúvidas durante a realização das experiências e do desenvolvimento deste trabalho.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Margarida Gomes Moldão-Martins, agradeço o apoio, orientação e esclarecimento de dúvidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Fernanda Balsemão, auxiliar no laboratório na Unidade de Tecnologia e Inovação do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, um grande obrigado por toda a ajuda dispensada durante a realização das experiências, assim como a amizade, o apoio e os conselhos.

Às minhas colegas e também amigas, Joana Gomes, Rita Marina Pereira e Mara Mota, um muito obrigada pelo apoio e companheirismo nestes 5 anos de faculdade, e acima de tudo pela amizade que fica.

Às minhas amigas de longa data, Catarina Costa e Cátia Lopes, um obrigado por tudo nestes 10 anos de amizade.

Ao meu namorado João, agradeço o amor, o apoio, a força e a motivação para conseguir acabar este trabalho.

Aos meus pais agradeço o amor, o carinho e o apoio que me deram, não só nesta fase, como em toda a minha vida. Vocês são o meu orgulho!

RESUMO

As betalainas são compostos corados usados para a produção de corante alimentar, sendo a beterraba vermelha a cultura mais usada para a sua extração. Este trabalho teve como objetivo procurar fontes alternativas à beterraba, e os frutos da figueira-da-índia têm vindo a ser estudados com esse propósito, sendo as espécies *Opuntia stricta* e *Opuntia robusta* estudadas neste trabalho.

Os figos-da-índia estudados apresentaram teores de betalainas totais sem diferenças significativas (4,34 e 3,03 mg/g de MS para *O. robusta* e *O. stricta*, respetivamente) sendo no entanto inferiores ao do extrato de beterraba vermelha (8,95 mg/g de MS). Contudo, os extratos de ambos os figos apresentaram um teor de compostos fenólicos superior ao de beterraba (69,13; 92,87 e 50,00 mg AG/g de MS para *O. robusta*, *O. stricta* e beterraba, respetivamente). O extrato do figo-da-índia *O. stricta* apresentou maior atividade antioxidante que o do *O. robusta* (EC_{50} = 5,74 e 12,66 mg/mL, respetivamente).

Os testes de termo e fotoestabilidade dos extratos revelaram que as betalainas são degradadas a temperaturas superiores a 75 °C durante 60 minutos, sendo mais estáveis à luz degradando-se ao fim de vários dias de exposição (7 dias para o extrato de beterraba e 35 dias para os extratos dos figos-da-índia), provocando alterações de cor dos extratos.

O encapsulamento dos extratos foi realizada pelo método de liofilização usando como matriz encapsulante o agar-agar, tendo a caracterização da matéria corante encapsulada revelado uma diminuição da atividade antioxidante e uma diminuição do teor de betalainas. O microencapsulamento do extrato de beterraba pelo método de *spray-dryer* apresentou melhores resultados comparativamente com a liofilização.

Palavras-chave: betalainas; *Opuntia* spp.; beterraba; microencapsulação; agar-agar.

ABSTRACT

The betalains are colored compounds used for food dye production, with red beet being the most used crop for its extraction. This work aimed to find alternative sources of beet, and the fruits of the *Opuntia* spp. have been studied for this purpose, being the species *Opuntia stricta* and *Opuntia robusta* studied in this work.

The studied cactus pears presented total betalain contents without significant differences (4,34 and 3,03 mg/g DW for *O. robusta* and *O. stricta*, respectively), but were lower than that of red beet extract (8,95 mg/g DW). However, extracts from both cactus pears had a higher phenolic content than beet (69,13; 92,87 and 50,00 mg AG/g DW for *O. robusta*, *O. stricta* and beet, respectively). *O. stricta* extract showed higher antioxidant activity than *O. robusta* ($EC_{50} = 5,74$ and 12,66 mg/mL, respectively).

The thermostability and photostability tests of the extracts revealed that the betalains are degraded at temperatures above 75 ° C for 60 minutes, being more stable to light, degrading after several days of exposure (7 days for beet extract and 35 days for cactus pears extracts), causing color changes in the extracts.

The encapsulation of the extracts was performed by the lyophilization using agar as encapsulating matrix, with the characterization of the encapsulated pigment revealed a decrease of the antioxidant activity and a decrease of the betalain content of the beet. The microencapsulation of the beet extract by the spray-dryer method presented better results compared to the lyophilization.

Key words: betalains; *Opuntia* spp.; beet root; microencapsulation; agar.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	II
RESUMO.....	III
ABSTRACT.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABELAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO	3
2.1. Betalaínas	3
2.1.1. Fatores que afetam a estabilidade das betalaínas	4
2.1.2. Fontes de betalaínas	
2.1.2.1. Beterraba	7
2.1.2.2. Figo-da-índia	9
2.2. Microencapsulamento de corantes naturais	13
2.2.1. <i>Spray-drying</i>	14
2.2.2. Liofilização.....	16
2.2.3. Matriz encapsulante.....	16
2.2.4. Microencapsulamento de betalaínas.....	18
3. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL	19
3.1. Material vegetal.....	19
3.2. Métodos Experimentais.....	20
3.2.1. Testes preliminares para obtenção da matéria corante.....	20
3.2.2. Estudos de termo e fotoestabilidade dos extratos.....	21
3.2.2.1. Termoestabilidade.....	21
3.2.2.2. Fotoestabilidade	23

3.2.3. Microencapsulamento dos extratos da beterraba vermelha e dos figos-da-índia.....	23
3.2.4. Estudos para a libertação do corante a partir dos microencapsulados de beterraba e das duas espécies de figo-da-índia.....	24
3.2.5. Métodos analíticos.....	25
3.2.5.1. Determinação do teor de betalaínas totais	25
3.2.5.2. Análise colorimétrica.....	25
3.2.5.3. Determinação das constantes de degradação e dos tempos de meia vida para os extratos nos estudos de fotoestabilidade.....	26
3.2.5.4. Determinação do teor de compostos fenólicos	27
3.2.5.5. Determinação da capacidade antioxidante	27
3.2.5.6. Caracterização morfológica dos microencapsulados por microscopia eletrónica de varrimento (<i>Scanning Eletron Microscopy</i> - SEM).....	29
3.2.6. Análise estatística dos resultados	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. Testes preliminares para obtenção da matéria corante	30
4.2. Estudos de termo e fotoestabilidade dos extratos.....	31
4.2.1. Termoestabilidade	32
4.2.2. Fotoestabilidade	35
4.3. Caracterização dos extratos antes e depois de microencapsulados.....	41
5. CONCLUSÕES	53
BIBLIOGRAFIA.....	55
ANEXO I – Preparação da curva de calibração para a determinação do teor de compostos fenólicos pelo método de <i>Folin-ciocalteau</i>.....	63
ANEXO II – Modo de preparação das soluções para a determinação da atividade antioxidante pelo método de redução do ião ferro (FRAP).....	64
ANEXO III – Preparação da curva de calibração para a determinação da atividade antioxidante pelo método de redução do ião ferro (FRAP).....	65

ANEXO IV – Resultados dos estudo de termoestabilidade dos extratos	66
---	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Ácido Betalâmico.....	3
Figura 2 – Betanina	3
Figura 3 – Indicaxantina	3
Figura 4 – Degradação térmica da betanina.....	5
Figura 5 – Degradação da betanina em condições ácidas, alcalinas e térmicas	6
Figura 6 – Distribuição mundial de catos do género <i>Opuntia</i> spp.	10
Figura 7 – Diferentes tipos de microcápsulas.	13
Figura 8 – Esquema de um <i>spray-dryer</i> em co-corrente.....	15
Figura 9 – Esquema de gelificação do agar-agar	17
Figura 10 – Figos-da-índia da espécie <i>Opuntia stricta</i> com pormenor da cor da polpa.....	19
Figura 11 – Figos-da-índia da espécie <i>Opuntia robusta</i> com pormenor da cor da polpa	19
Figura 12 – Teor de betalaínas totais na extração da matéria corante da beterraba vermelha assistida por ultrassons	30
Figura 13 – Teor de betalaínas totais na extração da matéria corante da beterraba vermelha por maceração em banho termostatizado (T=40 °C)	31
Figura 14 – Teor de betalaínas totais na extração da matéria corante da beterraba vermelha por maceração à temperatura ambiente sob agitação (T=18 °C).....	31
Figura 15 – Superfícies de resposta para o teor de betalaínas totais e cor (tonalidade (h°)) nos extratos de beterraba vermelha (A e A1) e de figo-da-índia <i>Opuntia robusta</i> (B e B1) em função do tempo e da temperatura	34
Figura 16 – Teor de betalaínas totais dos extratos de beterraba vermelha e dos figos-da-índia <i>Opuntia stricta</i> e <i>Opuntia robusta</i> nos estudos de fotoestabilidade.	36
Figura 17 – Análise colorimétrica do extrato de beterraba vermelha nos estudos de fotoestabilidade.	37
Figura 18 – Análise colorimétrica do extrato de figo-da-índia <i>Opuntia robusta</i> nos estudos de fotoestabilidade.	38
Figura 19 – Análise colorimétrica do extrato de figo-da-índia <i>Opuntia stricta</i> nos estudos de fotoestabilidade.	38
Figura 20 – Representação gráfica da relação linear de $\ln[Abs/Abs_0]$ em função do tempo para os extratos de beterraba (círculos amarelos) e dos figos-da-índia <i>Opuntia stricta</i> (triângulos vermelhos) e <i>Opuntia robusta</i> (quadrados azuis) e as respetivas retas de regressão	40
Figura 21 – Teor de betalaínas dos extratos de beterraba vermelha e dos figos-da-índia <i>Opuntia stricta</i> e <i>Opuntia robusta</i> antes e depois de microencapsulados por liofilização (L).	42

Figura 22 – Extrato de beterraba liofilizado (A) e microencapsulado em agar-agar por liofilização (B).....	42
Figura 23 – Atividade antioxidante (método DPPH) nos extratos de beterraba vermelha e dos figos-da-índia <i>Opuntia stricta</i> e <i>Opuntia robusta</i> antes e depois de microencapsulados por liofilização.....	44
Figura 24 – Atividade antioxidante (método FRAP) dos extratos de beterraba e figos-da-índia <i>Opuntia stricta</i> e <i>Opuntia robusta</i> antes e depois de microencapsulados por liofilização (L).	44
Figura 25 – Teor de compostos fenólicos nos extratos de beterraba vermelha e dos figos-da-índia <i>Opuntia stricta</i> e <i>Opuntia robusta</i> antes e depois de microencapsulados por liofilização (L).	46
Figura 26 – Imagens obtidas por SEM das microcápsulas dos extratos de beterraba vermelha e dos figos-da-índia <i>Opuntia stricta</i> e <i>Opuntia robusta</i> obtidas por liofilização	47
Figura 27 – Teor de betalaínas no extrato de beterraba vermelha antes e depois de microencapsulado pelos métodos de <i>spray-dryer</i> (SD) e liofilização (L).....	49
Figura 28 – Atividade antioxidante (método DPPH) do extrato de beterraba vermelha antes e depois de microencapsulado por <i>spray-dryer</i> (SD) e liofilização (L)	50
Figura 29 - Atividade antioxidante (método FRAP) do extrato de beterraba vermelha microencapsulado por <i>spray-dryer</i> (SD) e liofilização (L).....	50
Figura 30 – Teor de compostos fenólicos nos extratos de beterraba vermelha secos e microencapsulados por <i>spray-dryer</i> (SD) e liofilização (L).....	51
Figura 31 – Imagens obtidas por SEM das microencapsulas de extrato de beterraba vermelha obtidos por liofilização e <i>spray-dryer</i>	52
Figura 32 - Curva de calibração do método <i>Folin-Ciocalteu</i>	62
Figura 33 – Curva de calibração do método redução do ião ferro (FRAP).....	64
Figura 34 – Teor de betalaínas totais dos extratos de beterraba vermelha e figo-da-índia <i>Opuntia robusta</i> nos estudos de termoestabilidade	65
Figura 35 – Análise colorimétrica do extrato de beterraba vermelha nos estudos de termoestabilidade	65
Figura 36 – Análise colorimétrica do extrato de figo-da-índia <i>Opuntia robusta</i> nos estudos de termoestabilidade	66

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Matriz codificada e decodificada para o ensaio de termoestabilidade dos extratos de beterraba vermelha e de figo-da-índia <i>Opuntia Robusta</i>	22
Tabela 2 – Esquema das diluições para o método DPPH	28
Tabela 3 – Equações ajustadas pela MSR para o teor de betalaínas totais e análise colorimétrica (parâmetro h°) dos extratos de beterraba vermelha e de figo-da-índia <i>Opuntia robusta</i>	32
Tabela 4 – Resultados da análise colorimétrica em RGB dos extratos de beterraba vermelha e de figo-da-índia <i>Opuntia robusta</i> nos estudos de termoestabilidade.....	35
Tabela 5 – Resultados da análise colorimétrica em RGB obtidos nos estudos de fotoestabilidade dos extratos de beterraba vermelha e dos figos-da-índia <i>Opuntia stricta</i> e <i>Opuntia robusta</i>	39
Tabela 6 – Equações de regressão, coeficiente de regressão (r^2) e valores da constante de velocidade de degradação (K_d) e do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) ao longo do tempo de exposição à luz dos extratos de beterraba e dos figos-da-índia <i>Opuntia stricta</i> e <i>Opuntia robusta</i>	40
Tabela 7 – Modo de preparação das soluções para a curva de calibração do método <i>Folin-Ciocalteu</i>	62
Tabela 8 – Modo de preparação das soluções para a curva de calibração do método de redução do íão ferro (FRAP)	64

LISTA DE ABREVIATURAS

AG – ácido gálico

Ciclo-DOPA – ciclo-dihidroxifenilalanina

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EC₅₀ – concentração da amostra necessária para inibir a oxidação do radical em 50%

FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização para a Agricultura e Alimentação)

FRAP – *Ferric Ion Reducing Antioxidant Power* (método de redução do íão ferro)

IAA – Índice de Atividade Antioxidante

MSR – Metodologia de Superfícies de Resposta

MS – matéria seca

SEM – *Scanning Eletron Microscopy* (microscopia eletrónica de varrimento)

TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazina

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A conservação dos alimentos sempre foi uma necessidade, fazendo com que os aditivos alimentares tenham vindo a ser usados desde sempre, ainda que de forma não deliberada. Atualmente, os aditivos têm um papel importante na indústria alimentar pois têm como objetivo conservar, intensificar/melhorar ou modificar as propriedades dos alimentos, uma vez que desde a sua produção até ao consumidor, estes estão sujeitos a fatores, como alterações de temperaturas, que podem alterar a sua composição original. Os consumidores são cada vez mais exigentes, querendo uma maior variedade de alimentos, que respeitem padrões de qualidade e segurança alimentar, com preços acessíveis e que sejam convenientes. Desta forma, o uso de aditivos torna-se necessário para satisfazer estas necessidades.

O primeiro contacto do consumidor com um alimento ocorre através da visão. Desta forma a cor dos alimentos é um atributo importante pois influencia diretamente a perceção do sabor e da qualidade do produto tendo um impacto direto na aceitabilidade, escolha e preferência dos mesmos. Os corantes são uma categoria de aditivos alimentares cuja finalidade é conferir cor a alimentos desprovidos desta (como por exemplo, bebidas, produtos de pastelaria, pastilhas elásticas e gelados) e repor ou intensificar a cor de um alimento que poderá ter sido degradada devido ao processamento e à exposição a condições como luz, ar e temperaturas extremas (Lidon & Silvestre, 2010; Cardoso, 2003).

De uma forma geral existem dois tipos de corantes alimentares, os sintéticos e os naturais. Os corantes sintéticos são obtidos por via química e na União Europeia estão autorizados 17 destes corantes, podendo ser solúveis em água ou insolúveis. No caso de serem solúveis, apresentam-se sob a forma de pós finos, de grânulos ou líquida e são utilizados em bebidas, misturas secas, confeções diversas ou produtos do dia-a-dia. No caso de serem insolúveis, apresentam-se na forma de lacas, que são dispersões do corante num substrato de alumínio, produzidos como um pó muito fino, e cuja utilização é feita em alimentos com gordura ou óleos ou alimentos que não tenham solvente suficiente para dissolver o corante, como por exemplo, bolos, doces e pastilhas elásticas (Cardoso, 2003). Estes corantes estão muitas vezes relacionados com problemas de saúde do consumidor, nomeadamente, alergias e intolerâncias (Azeredo *et al.*, 2007; Lidon & Silvestre, 2007). Os corantes naturais são derivados de plantas e animais, e na UE estão autorizados 26 destes corantes. Eles têm a desvantagem de serem mais caros e menos estáveis que os sintéticos, pois são mais suscetíveis às mudanças de pH, à luz e à temperatura (Cardoso, 2003). Clorofilas, antocianinas, carotenoides e betalaínas são alguns exemplos de corantes extraídos de plantas (ou partes de plantas como frutos e raízes). Nos últimos anos, tem-se observado um interesse no desenvolvimento de corantes naturais como alternativa aos corantes sintéticos,

devido à crescente preocupação dos consumidores com a saúde e alimentação, o que leva a que haja uma maior preferência por produtos mais naturais.

Neste trabalho os corantes naturais em estudo são as betalaínas, sendo a cultura mais usada para a extração destes pigmentos, a beterraba vermelha (*Beta vulgaris* L. spp. *vulgaris*). As betalaínas são o corante alimentar vermelho-de-beterraba (identificado na UE como E162) usado em produtos lácteos, doces, gelatinas, bebidas não alcoólicas e produtos cárneos emulsionados (Azeredo, 2009; Vergara *et al.*, 2014). Apesar de a beterraba ser a cultura mais usada para a extração de betalaínas, existem alguns aspetos, como o característico sabor a terra (devido à presença dos compostos geosmina e pirazina), a acumulação de nitratos e a pouca variedade de cores obtida, que fazem com que se procure fontes alternativas para essa extração (Azeredo, 2009; Vergara *et al.*, 2014; Sáenz, Cancino & Robert, 2012).

A figueira-da-índia (*Opuntia* spp.) é uma cultura originária do México, sendo também conhecida em Portugal como piteira, figueira-do-diabo, tabaio ou tabaibo. No nosso país, a figueira-da-índia surge de forma espontânea, em zonas rurais e agrícolas, no entanto, em 2009 foi implementado o primeiro pomar ordenado em Sesimbra para exploração dos frutos, e desde então, esta cultura tem captado a atenção de investigadores e de produtores. De acordo com a APROFIT (Associação de Profissionais de Figos da Índia Portugueses) existem explorações de *Opuntia ficus-indica* e *Opuntia robusta* no país, com mais de 200 ha de pomares ordenados, sendo a região do Algarve onde se encontra a maior área plantada. Os frutos têm como principal destino o consumo em fresco, no entanto, e de forma a valorizar e incorporar valor à matéria-prima, novos produtos e aproveitamentos têm surgido, como a produção de sumos, compotas, geleias e licores (Alves, Mota & Oliveira, 2014; Ferreira *et al.*, 2016).

O principal objetivo deste trabalho é procurar fontes alternativas à beterraba para a obtenção de corante alimentar. Os frutos da figueira-da-índia, que são objeto de estudo neste trabalho, têm vindo a ser estudados como fontes alternativas, pelo que se pretende proceder ao encapsulamento do corante extraído de duas espécies de figo-da-índia (*Opuntia stricta* e *Opuntia robusta*) com o objetivo de aumentar a sua estabilidade, procedendo-se à sua caracterização funcional (teor de betalaínas totais, capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos) antes e depois de encapsulado. Neste trabalho também se irá proceder à extração, ao encapsulamento e à caracterização do corante da beterraba vermelha, como termo de comparação.

2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

2.1. Betalaínas

As betalaínas são compostos solúveis em água que contêm azoto na sua composição e que se encontram nos vacúolos das plantas. Estes compostos são restritos a 10 famílias de plantas da ordem *Caryophyllales* podendo ser também encontradas em fungos do género *Amanita*. Já foram identificadas cerca de 75 estruturas de betalaínas e estes compostos apresentam um precursor comum, o ácido betalâmico (figura 1), sendo possível dividi-los em dois grupos (Khan, 2016; Delgado-Vargas, Jiménez & Paredes-López, 2000; Herbach, Stintzing & Carle, 2006):

- Betacianinas – Resultam da condensação do ácido betalâmico com derivados de ciclo-dihidroxifenilalanina (ciclo-DOPA) seguido por glicosilação, ou por condensação de ciclo-DOPA glicosidados com o ácido betalâmico, e apresentam uma coloração vermelha-violeta com um máximo de absorção que varia entre 530 e 540 nm. Existe uma grande variedade de betacianinas sendo que a maioria tem como estrutura base a betanidina e o seu epímero, a isobetanidina. A betanina (figura 2) é um glicosídeo da betanidina sendo a betacianina mais abundante.

- Betaxantinas – Resultam da condensação do ácido betalâmico com aminoácidos ou aminas. A condensação com diferentes aminoácidos resulta em diferentes betaxantinas, sendo as mais comuns a vulgaxantina I (glutamina-betaxantina) e a indicaxantina (figura 3) (prolina-betaxantina). As betaxantinas apresentam uma coloração amarela-alaranjada com um máximo de absorção que varia entre 460 e 480 nm.

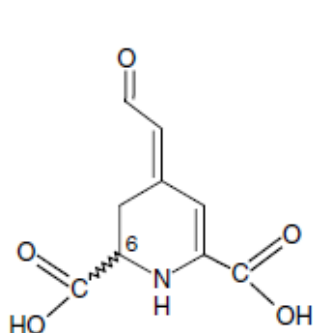


Figura 2 – Ácido Betalâmico

Fonte: Adaptado de Herbach, Stintzing & Carle, 2006

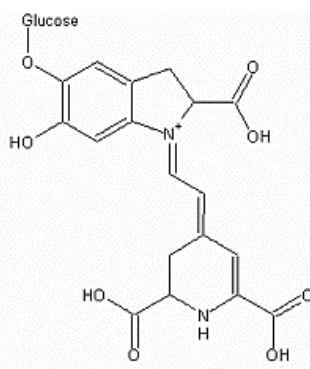


Figura 3 – Betanina

Fonte: Adaptado de Sáenz, Cancino & Robert, 2012

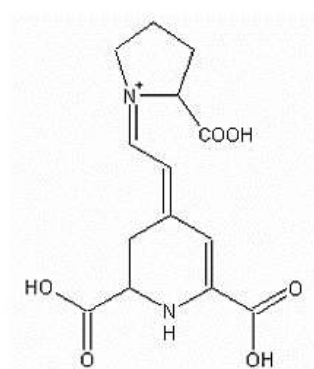


Figura 1 – Indicaxantina

Fonte: Adaptado de Sáenz, Cancino & Robert, 2012

2.1.1. Fatores que afetam a estabilidade das betalaínas

Como todos os corantes naturais, a estabilidade das betalaínas é uma preocupação sendo afetada por diversos fatores que devem ser considerados de forma a assegurar uma maior retenção do pigmento e da sua cor:

- **Temperatura**

A temperatura é um dos fatores que mais afeta a estabilidade destes corantes durante o processamento e o armazenamento, uma vez que as betalaínas são suscetíveis ao calor perdendo a sua estabilidade a temperaturas elevadas (acima de 50 °C). A taxa de degradação das betalaínas segue uma cinética de reação de primeira ordem, uma vez que esta taxa aumenta à medida que se aumenta a temperatura e o tempo de aquecimento (Herbach, Stintzing & Carle, 2006; Delgado-Vargas, Jiménez & Paredes-López, 2000; Azeredo, 2009).

Fernández-López *et al.* (2013) estudaram a estabilidade térmica de seis extratos naturais usados como corantes alimentar, entre eles os extratos de beterraba vermelha e de figo-da-índia da espécie *Opuntia stricta*. A estabilidade térmica foi testada a temperaturas de 50, 70 e 90 °C, tendo-se avaliado a degradação da cor a nível espectrofotométrico e visual, em intervalos de tempo até 6 horas. Os autores concluíram que os extratos de beterraba e de figo-da-índia foram os mais termosensíveis pois, nas três temperaturas testadas, foram os extratos com maior degradação, tendo esta sido maior à temperatura de 90 °C.

A taxa de degradação térmica da betanina em solução depende do pH sendo que a máxima estabilidade em condições anaeróbias dá-se em pH entre 4 e 5, e em condições aeróbias, entre 5 e 6 (Kaimainen, 2014). Na figura 4 é representada a degradação térmica da betanina e os produtos resultantes dessa degradação. Com o aquecimento, a betanina vai perdendo a sua cor vermelha devido à degradação por isomerização (resultando na formação de isobetanina), descarboxilação (a perda de CO₂ resulta em betaninas descarboxiladas), desidrogenação (a perda de H⁺ leva à formação de neobetanina), perda da unidade glicosídea (que resulta na formação de betanidina) e quebra da ligação aldimina (que origina ácido betalâmico e ciclo-Dopa 5-O-β-glicosídeo) (Delgado-Vargas, Jiménez & Paredes-López, 2000; Azeredo, 2009; Kaimainen, 2014).

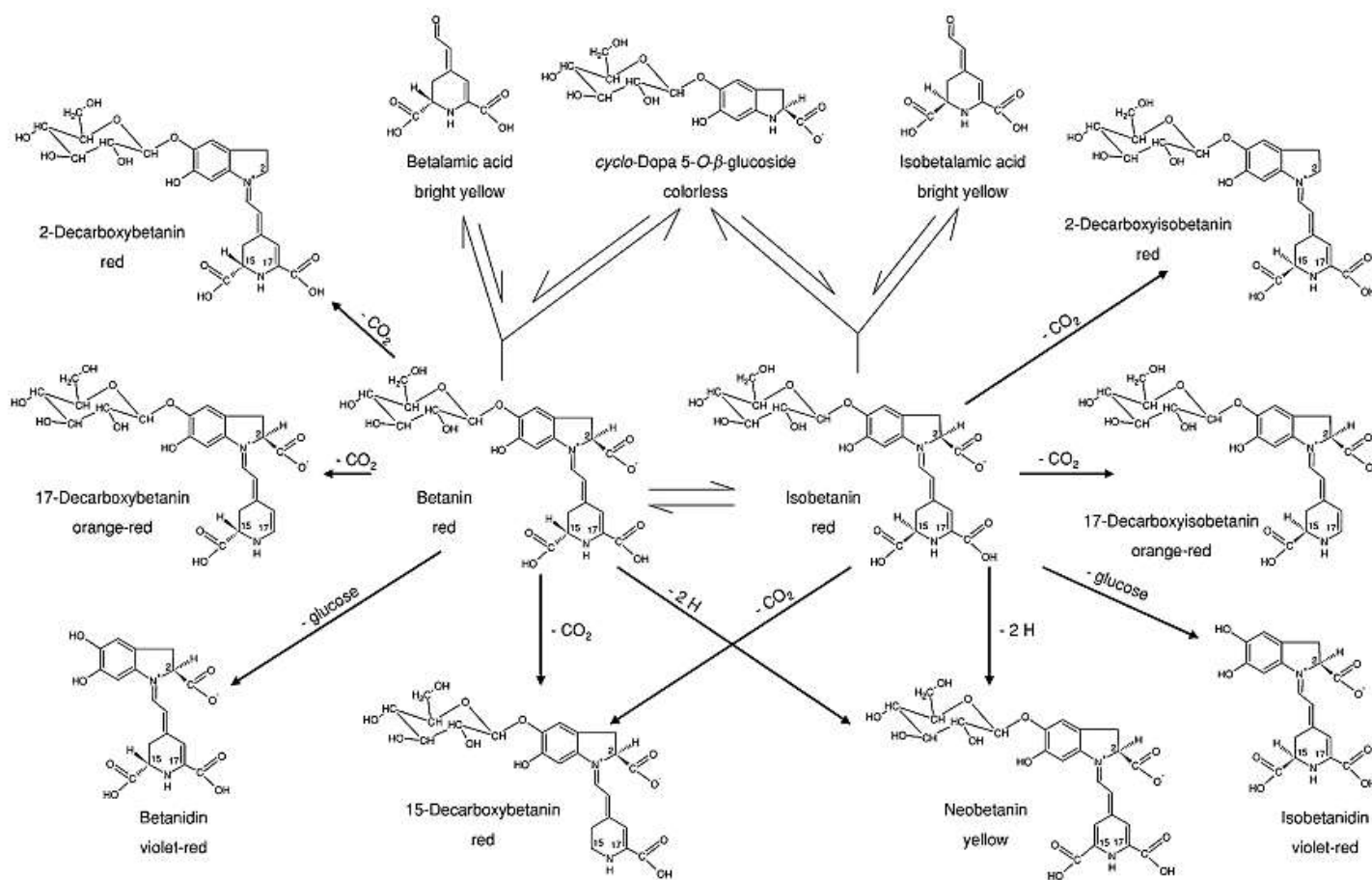


Figura 4 – Degradação térmica da betanina

Fonte: Kaimainen, 2014

• pH

No geral, as betalainas são relativamente estáveis entre valores de pH de 3 a 7, no entanto, as betacianinas apresentam uma maior estabilidade entre os valores de pH de 4 e 6, e as betaxantinas, entre 4 e 7 (Azeredo, 2009; Herbach, Stintzing & Carle, 2006). Cai, Sun & Corke (1998) avaliaram a cor, as características espectrais e a estabilidade das betacianinas de 21 genótipos de 7 espécies de *Amaranthus*. Um dos genótipos foi testado entre valores de pH de 2,2 e 10, durante 24 horas de armazenamento a 25 °C, sendo que os autores observaram uma absorvância máxima a 535 nm nas soluções com valores de pH entre 5 e 7, tendo as soluções mantido a sua cor. Nos valores de pH fora desta faixa, os valores de absorvância a 535 nm foram menores, tendo-se observado uma alteração das cores das soluções. Os autores concluíram que os pigmentos deste genótipo tinham maior estabilidade a valores de pH de 5 a 7, a 25 °C, sendo maior a pH 5,6.

Na figura 5 é representada a degradação da betanina sob condições ácidas, alcalinas e térmicas. Em condições alcalinas (pH > 10), esta degrada-se em ácido betalâmico e em *ciclo-Dopa-5-O-β-glicosídeo*, no entanto, esta reação é reversível, podendo o pigmento ser

regenerado a temperaturas abaixo de 10 °C e a um pH entre 4 e 5. Em condições ácidas também ocorre a degradação da betanina com formação de isobetanina ou neobetanina e em condições muito ácidas dá-se a formação de betanidina (Kaimainen, 2014; Azeredo, 2009).

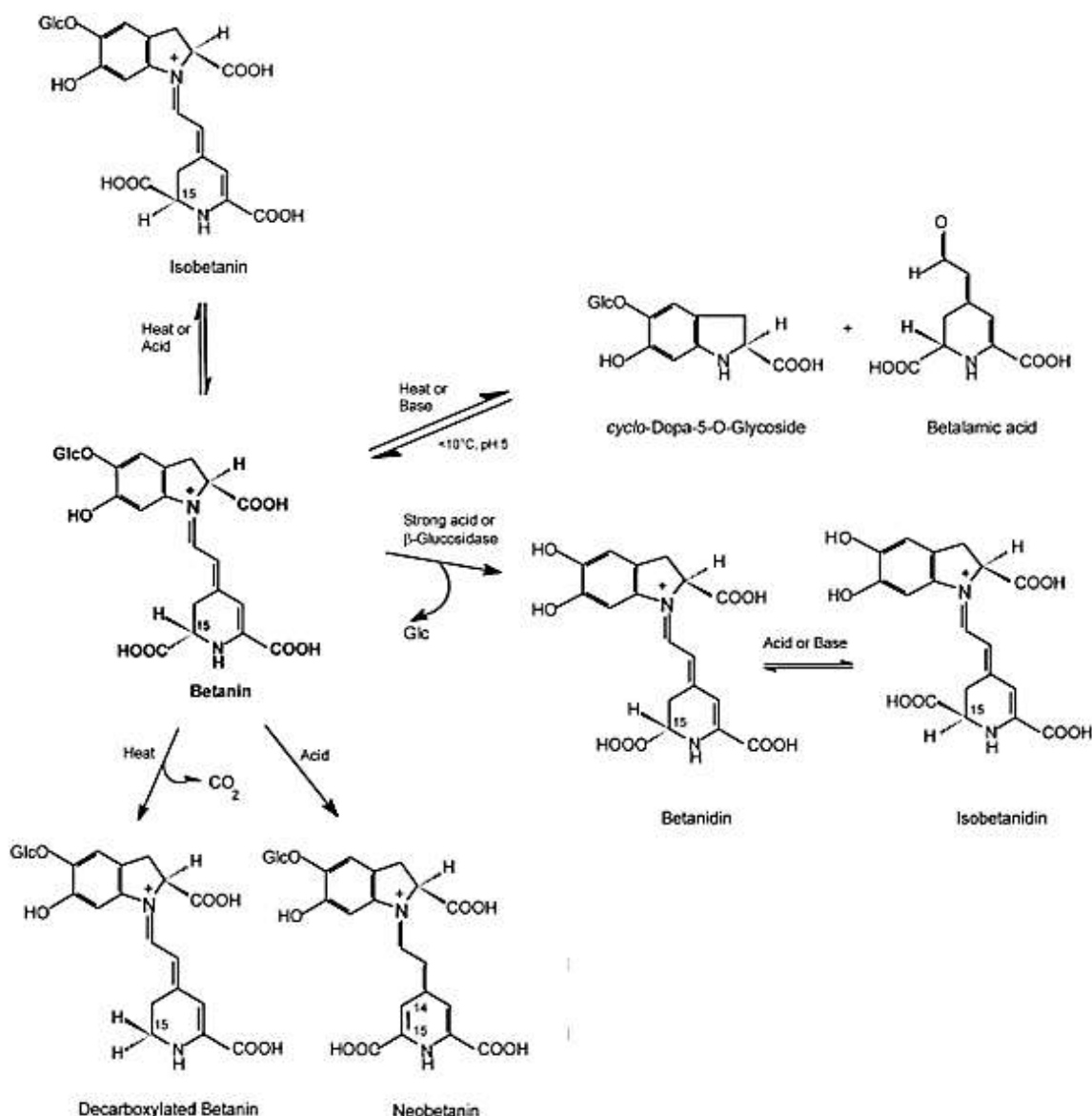


Figura 5 – Degradação da betanina em condições ácidas, alcalinas e térmicas

Fonte: Adaptado de Stintzing & Carle, 2004

- **Atividade da água (a_w)**

A água é um fator relevante em muitas reações de degradação, influenciando também a estabilidade das betalainas, que é afetada exponencialmente pelo a_w , diminuindo uma ordem de grandeza quando o a_w aumenta de 0,32 para 0,75 (Azeredo, 2009). A estabilidade da betanina é melhorada se houver uma redução de a_w para valores abaixo de 0,63. A estabilidade de betacianinas aumenta depois de serem expostas a métodos de redução da

atividade da água como aumento da concentração e *spray-drying* (Azeredo, 2009). O aumento da estabilidade das betalaínas com a diminuição do a_w poderá estar relacionado com a limitada solubilidade do oxigênio (Delgado-Vargas, Jiménez & Paredes-López, 2000).

- **Oxigênio e luz**

As betalaínas reagem com o oxigênio molecular, de modo que a degradação deste pigmento é menor na presença de baixos níveis de oxigênio do que na presença do ar atmosférico, pois os baixos níveis favorecem a recuperação parcial do pigmento depois de degradado. A estabilidade das betalaínas ao oxigênio é melhorada com a utilização de agentes antioxidantes ou através de uma atmosfera rica em azoto, por ser um gás inerte (Azeredo, 2009; Herbach, Stintzing & Carle, 2006)

A exposição das betalaínas à luz afeta negativamente a estabilidade destes compostos, sendo que a sua estabilidade e a intensidade da luz são inversamente proporcionais, ou seja, quanto maior a intensidade da luz, menor a estabilidade dos pigmentos (Herbach, Stintzing & Carle, 2006; Azeredo, 2009)

2.1.2. Fontes de betalaínas

As betalaínas podem ser encontradas em várias partes de plantas como raízes, frutos e flores, no entanto, são conhecidas poucas fontes comestíveis. A beterraba vermelha ou amarela, a acelga, o amaranto, a figueira-da-índia são alguns exemplos de fontes comestíveis, sendo a primeira a mais usada para a extração de betalaínas (Azeredo, 2009; Vergara *et al.*, 2014).

2.1.2.1. Beterraba vermelha

A beterraba é uma planta da família das *Chenopodiaceae* (*quenopodiáceas*) pertencente a espécie *Beta vulgaris* L.. Do ponto de vista botânico é possível dividi-la em três subespécies (Hernandes *et al.*, 2007; Lange, Brandenburg & Bock, 1999):

- *Beta vulgaris* spp. *adanesis* – são um grupo de plantas semi-anuais com características morfológicas específicas e que apresentam um grande declínio na autofertilização;
- *Beta vulgaris* spp. *maritima* – esta subespécie é formada por um grande complexo de tipos morfológicos que ocorrem numa vasta área geográfica e cujas diferenças não são suficientes para estabelecer outras subdivisões;
- *Beta vulgaris* spp. *vulgaris* – nesta subespécie estão incluídas todas as cultivares já domesticadas. A esta subespécie pertencem quatro grupos:

- Grupo de beterrabas folhosas – a este grupo pertencem as cultivares cujas partes comestíveis são as folhas e os pecíolos, como por exemplo, a acelga;
- Grupo de beterrabas açucareiras – as cultivares pertencentes a este grupo têm um alto teor de sacarose e boas qualidades de extração, sendo por isso usadas para a produção de sacarose. As cultivares variam pouco entre si, quer na forma quer na cor, apresentando um coloração branca.
- Grupo de beterrabas forrageiras – a este grupo pertencem as cultivares usadas para alimentação de gado, sendo que estas variam entre si, tanto na forma como na cor.
- Grupo de beterrabas hortícolas – as cultivares pertencentes a este grupo apresentam uma parte tuberosa comestível, e a maioria apresenta uma coloração vermelha intensa, no entanto também podem apresentar uma coloração amarela e rosada. A beterraba vermelha insere-se neste grupo.

• **Composição em betalaínas**

A coloração vermelha que caracteriza a beterraba vermelha é devida à presença de betalaínas, mais concretamente, de betanina, sendo que também se podem encontrar vulgaxantinas I e II. O conteúdo de betacianinas e de betaxantinas depende da cultivar da beterraba, podendo variar entre 0,04 – 0,21 % e 0,02 – 0,14 %, respetivamente (Azeredo, 2009).

Gasztanyi *et al.* (2001) estudaram cinco variedades de beterrabas, tendo investigado quais as betalaínas presentes em cada uma e em que quantidades. Os autores concluíram que as betacianinas predominantes nas cinco variedades eram betanina, isobetanina, betanidina e isobetanidina, sendo a betanina encontrada em maiores quantidades (com valores entre 0,41 – 0,50 g/kg). As betaxantinas mais predominantes eram as vulgaxantinas I e II, com valores entre 0,32 – 0,42 g/kg e 0,03 – 0,06 g/kg, respetivamente.

Kujala *et al.* (2002) analisaram quatro cultivares de beterraba relativamente à sua composição em betalaínas tendo identificado a betanina, isobetanina e as vulgaxantinas I e II. Em cada cultivar, tanto a betanina como a isobetanina foram encontradas em maiores quantidades na casca do que na polpa.

Haj Koubaier *et al.* (2014) analisaram a composição em betalaínas assim como a composição fenólica e a atividade antioxidante nos extratos de caules e de raízes da beterraba vermelha. Os autores concluíram que a distribuição das betalaínas é mais concentrada nas raízes do que nos caules, sendo as betalaínas presentes em maiores quantidades a betanina, a isobetanina e a vulgaxantina I.

- **Composição fenólica e atividade antioxidante**

Para além da composição em betalaínas, Kujala *et al.* (2002) também analisaram as quatro cultivares de beterraba relativamente à sua composição fenólica tendo identificado conjugados de ácido ferúlico, amidas fenólicas e flavonoides.

Haj Koubaier *et al.* (2014) também analisaram a composição fenólica e a atividade antioxidante nos extratos de caules e de raízes da beterraba vermelha. Foram identificados, através de análises por HPLC, ácidos fenólicos (ácidos ferúlico, vanílico, sirínico, elágico, cafeico, gálico, clorogénico) e flavonoides (quercetina, kampferol, miricetina e rutina) na beterraba, sendo que os caules apresentaram um teor ($14,6 \pm 0,5$ mg de AG/g de extrato) significativamente maior que as raízes. Quanto à atividade antioxidante, o estudo demonstrou que as raízes apresentavam uma maior atividade antioxidante que os caules ($EC_{50} = 5 \pm 1$ e 47 ± 3 µg/mL de extrato, respetivamente) havendo uma correlação entre o teor de betalaínas e a atividade antioxidante.

Kähkönen *et al.* (1999) estudaram a atividade antioxidante de um total de 92 extratos de plantas comestíveis e não-comestíveis contendo compostos fenólicos e dos vegetais analisados, o extrato da casca da beterraba foi um dos que apresentou maior atividade antioxidante, sendo superior aos extratos de cenoura e tomate. O teor de compostos fenólicos para este extrato foi de $4,3 \pm 0,2$ mg AG/g de peso seco. Os autores concluíram que não foi possível encontrar uma correlação significativa entre o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante dos extratos. Contudo, Kaur & Kapoor (2002) analisaram extratos de 36 vegetais asiáticos tendo concluindo que existe correlação significativa e positiva da atividade antioxidante com o teor de fenólicos totais. Neste estudo a beterraba apresentou uma atividade antioxidante (expressa em percentagem de inibição de oxidação) superior a 70 %.

2.1.2.2. Figo-da-índia

A figueira-da-índia é um cato do género *Opuntia* spp. pertencente à família botânica *Cactaceae*. Estes catos são originários do México, no entanto estão distribuídos um pouco por todos os continentes, como exemplificado na figura 6. Os catos *Opuntia* spp. estão associados a zonas árias ou semi-áridas, onde a possibilidade de crescimento de frutas e vegetais é limitante, uma vez que têm capacidade de resistir a climas muito quentes e a longos períodos de seca (FAO, 2013).

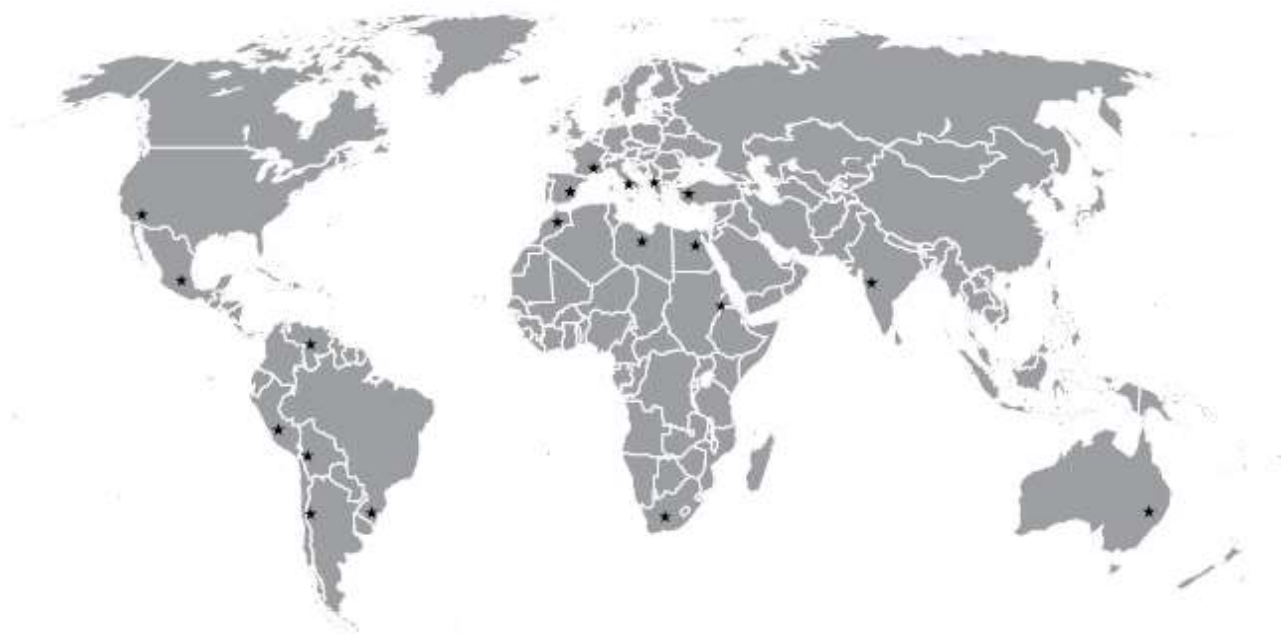


Figura 6 – Distribuição mundial de cactos do gênero *Opuntia* spp.

Fonte: FAO, 2013

Diferentes espécies de *Opuntia* apresentam diferentes características botânicas. Podem crescer entre 3,5 – 5 metros de altura e possuem um sistema radicular extenso, altamente ramificado e com uma grande quantidade de raízes finas que facilitam a absorção de água e nutrientes (FAO, 2013).

Os cladódios (as palmas) têm uma forma oval ou alongada que podem crescer até aos 60-70 cm, tendo capacidade de armazenar grandes quantidades de água, estando também protegidos por uma espessa cutícula que impede a perda da mesma. Os cladódios possuem areolas ou gemas de ambos os lados, através das quais se desenvolvem novos cladódios, flores ou raízes, dependendo das condições climáticas. As areolas também podem ou não apresentar espinhos (FAO, 2013).

As flores são sésseis (não possuem pecíolo), hermafroditas (apresentam órgãos reprodutores de ambos os sexos) e solitárias, apresentando cores variadas, florescendo uma vez por ano na borda superior dos cladódios (FAO, 2013).

Os frutos, designados de figos-da-índia, são classificados como pseudofrutos e, dependendo da variedade, apresentam diversas formas, tamanhos e cores, desde vermelho, laranja, roxo, amarelo e verde. Os figos-da-índia são frutos não climatéricos, ou seja, não amadurecem depois de colhidos. A sua epiderme é semelhante à dos cladódios, apresentando areolas com espinhos, que permanecem mesmo depois do amadurecimento dos frutos. A polpa dos frutos pode ou não apresentar sementes, dependendo da espécie (FAO, 2013).

Existem diversas possibilidades de utilização dos catos *Opuntia* spp. sendo o seu aproveitamento quase integral (Alves, Mota & Oliveira, 2014; Sáenz *et al.*, 2006):

- Os cladódios podem ser consumidos na alimentação humana ou então como alimento para gado em regiões com grandes períodos de seca. São também usados para a produção de sumos, compotas, pickles e o gel que escorre dos cladódios também pode ser usado para a produção de um xarope para combater a tosse convulsa;
- As flores, quando secas, podem ser usadas para a produção de uma infusão;
- Os frutos podem ser consumidos em fresco sendo também utilizados para a produção de sumos, compotas, geleias e licores. Das sementes, que se encontram na polpa, é possível extrair um óleo que pode ser incorporado em cosméticos;
- Os catos *Opuntia cochenillifera* são conhecidos como hospedeiros do inseto cochonilha do carmim (*Dactylopius coccus* Costa) a partir do qual se extrai o corante carmim de cochonilha (identificado na UE como E120).

Para além de serem usados na alimentação, os figos-da-índia têm vindo a ser estudados como uma alternativa à beterraba vermelha para a extração de betalaínas. A espécie mais cultivada a nível mundial é a *Opuntia ficus-indica*, sendo identificada como a principal fonte de betalaínas. No entanto existem outras espécies de *Opuntia* spp. onde estes pigmentos foram identificados, como é o caso das espécies *Opuntia stricta* e *Opuntia robusta*, que são objeto de estudo deste trabalho (Sáenz *et al.*, 2006; Sáenz, Cancino & Robert, 2012).

• **Composição em betalaínas**

Os figos da espécie *Opuntia stricta* caracterizam-se por apresentarem espinhos e uma coloração roxa tanto na epiderme como na polpa. Castellar *et al.* (2003) analisaram três espécies de figo-da-índia (*Opuntia stricta*, *Opuntia undulata* e *Opuntia ficus-indica*) relativamente às propriedades da cor e a estabilidade de betacianinas, tendo sido determinado o conteúdo de betalaínas. Na espécie *Opuntia stricta* os autores apenas detetaram betacianinas, mais concretamente a betanina e a isobetanina, com um conteúdo de betalaínas de 80 mg/100 g de fruto fresco, sendo este valor bastante superior ao das outras duas espécies analisadas, nas quais foram detetadas betacianinas e betaxantinas. Fernández-López *et al.* (2002) também analisaram as mesmas espécies que Castellar *et al.* (2002) tendo obtido, para a espécie *Opuntia stricta*, um conteúdo de betalaínas de 70 mg/100 g de fruto fresco.

Os figos da espécie *Opuntia robusta* caracterizam-se por apresentarem espinhos e uma coloração vermelha tanto na epiderme como na polpa. Castellanos-Santiago & Yahia (2008)

estudaram dez cultivares mexicanas de figos-da-índia, identificando e quantificando as betalaínas presentes em cada uma. A variedade “camuesa”, cuja classificação taxonómica é *Opuntia robusta*, foi a que apresentou o maior conteúdo de betalaínas (8,1 mg/g de fruto seco) sendo comparável com a beterraba (8,6 mg/g de peso seco). Nesta variedade foram detetadas betacianinas e betaxantinas, mais concretamente, a betanina e a indicaxantina. Yahia & Mondragon-Jacobo (2011) também caracterizaram dez cultivares de figos-da-índia de diferentes cores, a nível do seu conteúdo nutricional e da sua capacidade antioxidante, sendo que a variedade “camuesa” foi a que apresentou um maior conteúdo de betalaínas.

- **Composição fenólica e atividade antioxidante**

Num estudo realizado por Fernández-López *et al.* (2010) foram analisados os extratos das espécies de figos-da-índia *Opuntia stricta*, *Opuntia ficus-indica* e *Opuntia undulata* relativamente à sua composição em flavonoides, betalaínas e fenólicos totais, tendo também sido determinada a sua atividade antioxidante. O figo-da-índia *Opuntia ficus-indica* foi o que apresentou maior atividade antioxidante, e juntamente com o *Opuntia stricta*, apresentaram o maior teor de fenólicos totais ($218,8 \pm 2,9$ e $204,4 \pm 4,2$ mg de AG/100 g de fruto fresco, respetivamente), sendo que o segundo apresentou um maior teor de flavonoides.

Yeddes *et al.* (2013) realizaram um estudo comparativo da atividade antioxidante e composição química de extratos da epiderme e da polpa de três espécies de *Opuntia* spp. (*Opuntia stricta* e duas espécies de *Opuntia ficus-indica*). Os resultados indicaram que a espécie *Opuntia stricta* apresentava a maior atividade antioxidante ($EC_{50} = 0,40$ e $0,43$ mg/mL, na epiderme e na polpa, respetivamente), independentemente da parte do fruto. Relativamente ao teor de compostos fenólicos totais, os resultados mostraram que existe maior teor na epiderme do que na polpa dos três figos estudados, sendo que o teor no *Opuntia stricta* é menor.

Para além de caracterização ao nível do conteúdo nutricional, Yahia & Mondragon-Jacobo (2011) também caracterizaram as dez cultivares de figos-da-índia de diferentes cores relativamente à sua capacidade antioxidante, onde observaram que a variedade “Camuesa” (*O. robusta*) apresentou um dos maiores teores de compostos fenólicos totais (130 mg AG/100 g de peso fresco) assim como uma das maiores atividades antioxidante.

Pinedo-Espinoza *et al.* (2017) analisaram a evolução dos compostos bioativos e da atividade antioxidante durante o processo de amadurecimento de doze espécies mexicanas de *Opuntia* spp.. Os autores concluíram que a atividade antioxidante aumenta ao longo do amadurecimento dos frutos estando correlacionada com o aumento da concentração dos

compostos bioativos como os fenólicos, flavonoides e pigmentos. A quando do seu amadurecimento total, as variedades “Tapó Aguanoso” e “Burra la Cruz” (*O. robusta* var. *robusta*) apresentaram um teor de compostos fenólicos totais de $120,60 \pm 60$ e $194,69 \pm 0,36$ mg AG/100 g peso fresco, e uma atividade antioxidante de $6,07 \pm 0,01$ e $5,77 \pm 0,03$ μ mol de Trolox/g de peso fresco, respetivamente.

2.2. Microencapsulamento de corantes naturais

O microencapsulamento é uma técnica que consiste em aprisionar um ou mais compostos (designado de encapsulado ou núcleo) num filme contínuo de um material polimérico (designado de matriz encapsulante ou parede), formando estruturas (cápsulas ou esferas) cujo tamanho varia entre os micrómetros e alguns milímetros (Shekhar *et al.*, 2010; Gharsallaoui *et al.*, 2007; Özkan & Bilek, 2014).

O encapsulado pode estar no estado sólido, líquido ou gasoso, sendo que esse estado influencia tanto o tamanho como a forma da cápsula. Encapsulados sólidos ou cristalinos formam microcápsulas de forma irregular, ao contrário de encapsulados líquidos que tendem formar microcápsulas esféricas (Shekhar *et al.*, 2010). Existem também vários tipos de microcápsulas (figura 9) que podem ser classificadas dependendo do número de compostos que fazem parte do encapsulado e do número de matrizes encapsulantes (Kaimainen, 2014):

- Microcápsulas de parede simples – apenas possuem um tipo de matriz encapsulante a envolver o encapsulado;
- Microcápsulas com multi-camada – possuem várias matrizes encapsulantes a envolver o encapsulado;
- Microcápsulas com multi-núcleo – o encapsulado das microcápsulas é composto por vários compostos que se encontram incorporados na matriz encapsulante.

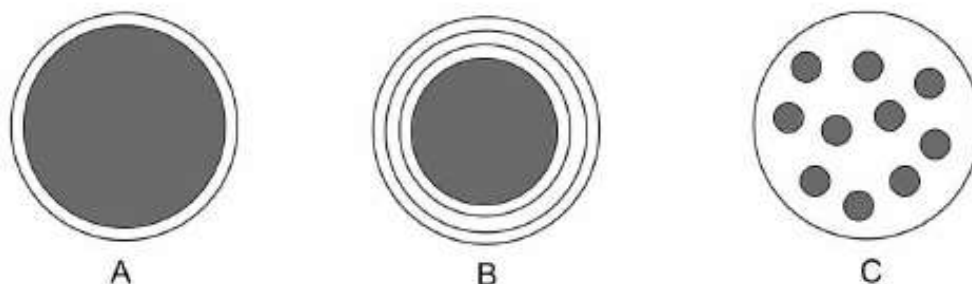


Figura 7 – Diferentes tipos de microcápsulas. A – Parede simples; B – Multi-camada; C – Multi-núcleo

Fonte: Kaimainen, 2014

A forma e o tipo de microcápsula dependem tanto das propriedades do encapsulado e da matriz encapsulante como do método usado para o microencapsulamento (Kaimainen, 2014). De uma forma geral, o microencapsulamento permite (Shekhar *et al.*, 2010; Gharsallaoui *et al.*, 2007; Kandasamy, 2012; Özkan & Bilek, 2014):

- Proteger o encapsulado de condições ambientais indesejáveis, como luz, humidade e oxigénio, estabilizando desta forma compostos sensíveis;
- Controlar a libertação do encapsulado;
- A alteração de propriedades físicas do encapsulado para fácil manuseamento;
- Suprimir aromas ou sabor indesejados do encapsulado;
- Separar componentes de misturas que podem reagir facilmente.

O microencapsulamento tem aplicabilidade em várias áreas como indústria farmacêutica, cosmética, têxtil, tintas e indústria alimentar. Nesta última, esta técnica é aplicada a compostos suscetíveis a alteração como compostos de cheiro e de aroma, e mais recentemente, a corantes naturais.

Nos últimos anos, o desenvolvimento que tem ocorrido a nível dos corantes naturais passa pela melhoria da sua estabilidade. Para tal, novas tecnologias de processamento têm surgido, nomeadamente a microencapsulação, que apresenta um conjunto de vantagens como (Cardoso, 2003; Ravichandran *et al.*, 2014; Özkan & Bilek, 2014):

- Aumento da estabilidade dos corantes, e consequentemente, um aumento do seu tempo de vida útil;
- Torna os corantes facilmente manuseáveis;
- Produção de diferentes tonalidades de cor.

Existem diversos métodos de microencapsulamento de corantes naturais, nomeadamente, *spray-drying*, liofilização, coacervação e emulsificação (Özkan & Bilek, 2014). Neste trabalho, serão usados os métodos *spray-drying* e liofilização para o encapsulamento de betalaínas, tendo-se escolhido o agar-agar como matriz encapsulante, pelo que seguidamente se abordam brevemente estes três tópicos.

2.2.1. *Spray-drying*

Apesar de terem sido desenvolvidas várias técnicas de microencapsulamento, o método de *spray-drying* é a técnica mais usada na indústria alimentar devido ao seu baixo custo e fácil disponibilidade de equipamento (Gharsallaoui *et al.*, 2007). De uma forma geral, o(s) composto(s) de interesse é/são misturado(s) com a matriz encapsulante num solvente

apropriado (normalmente água), formando uma solução ou suspensão. Na figura 8 é apresentado um esquema de um *spray-dryer* em co-corrente. Este aparelho é composto por um atomizador, uma câmara de secagem e um sistema de recolha em ciclone (Zuidam & Shimoni, 2010).

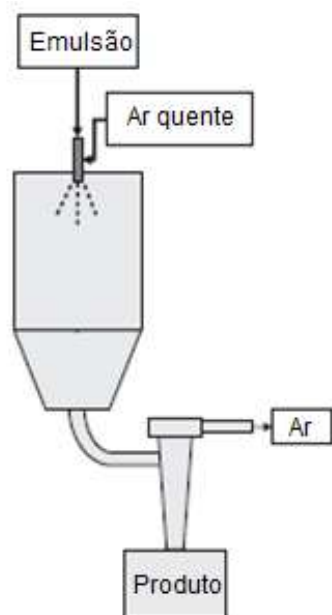


Figura 8 – Esquema de um *spray-dryer* em co-corrente

Fonte: Adaptado de Zuidam & Shimoni, 2010

O *spray-dryer* possui um atomizador, para onde é bombeada a solução ou suspensão preparada, transformando-a num aerossol. Quando as gotículas que formam o aerossol entram em contacto com o ar quente presente no interior da câmara de secagem ocorre a evaporação do solvente, dando-se assim o encapsulamento do(s) composto(s) na matriz encapsulante, formando as microcápsulas que são recolhidas no sistema de recolha do aparelho (Özkan & Bilek, 2014; Khan, 2016; Kandansamy & Somasundaram, 2012).

A atomização da solução ou suspensão vai transformá-la num aerossol, que é constituído por pequenas gotículas da solução. A atomização tem como objetivo criar uma maior superfície de transferência de calor, isto é, aumentar a área de contato entre a solução e o ar quente que entra na câmara de secagem, de forma a otimizar os fenómenos de transferência de calor e de massa. Existem diferentes tipos de atomizadores (atomizadores de pressão, centrífugos e pneumáticos) que são escolhidos

dependendo da natureza e da viscosidade da solução que vai ser bombeada. Eles têm de criar um aerossol cujas gotículas que o formam sejam homogêneas e de tamanho uniforme (Kandansamy & Somasundaram, 2012; Costa *et al.*, 2015; Ré, 1998).

Na câmara de secagem, o contato entre o aerossol e o ar quente pode ocorrer de duas formas: em co-corrente ou em contra-corrente. No contato em co-corrente, o aerossol e o ar quente (com temperaturas que rondam os 150 °C e 220 °C) entram na mesma direção ocorrendo a evaporação instantânea do solvente. As degradações térmicas são reduzidas pois o pó resultante é exposto a temperaturas moderadas, que rondam os 50 °C e 80 °C. No contato em contra-corrente, o aerossol entra na direção contrária ao fluxo de ar quente, expondo desta forma o pó resultante a temperaturas elevadas. No entanto, o contato em contra-corrente é considerado mais económico pois consome menos energia (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

O método de *spray-drying* é simples, económico, rápido e apresenta como vantagens: ser aplicável a soluções de polímeros hidrofílicos e hidrofóbicos; poder ser usado para compostos sensíveis a temperaturas elevadas, uma vez que o tempo de contacto com ar quente é muito

curto. No entanto, este método apresenta como desvantagens: as perdas do produto microencapsulado devido à adesão deste às paredes da câmara de secagem; a possível degradação de compostos sensíveis às altas temperaturas; existência de um número limitado de matrizes encapsulantes disponíveis (Özkan & Bilek, 2014).

2.2.2. Liofilização

O método de liofilização é o mais usado para compostos termossensíveis, como compostos de aroma e essências. Neste método a preparação da solução/suspensão é semelhante ao método de *spray-dryer*, sendo que o(s) composto(s) de interesse e a matriz encapsulante são dissolvidos em água. Um liofilizador é composto por uma câmara de secagem, uma fonte de calor, um condensador e uma bomba de vácuo. O processo é normalmente dividido em três etapas: congelação, secagem por sublimação e secagem secundária (Özkan & Bilek, 2014; Lorentzen, 1981).

Apesar de ser um método simples, a liofilização apresenta algumas desvantagens, como o facto de ser extremamente cara uma vez que consome muita energia (sendo 30 – 50 vezes mais caro que o *spray-dryer*), e de ser um processo longo (demora cerca de 48 horas) (Özkan & Bilek, 2014; Zuidam & Shimoni, 2010; Terroni *et al.*, s/d).

2.2.3. Matriz encapsulante

Na microencapsulação, os compostos de interesse são revestidos por uma ou mais matrizes encapsulantes, sendo por isso um aspeto importante, pois para além de proteger o encapsulado e de controlar a libertação do mesmo, determina a eficiência do processo e a estabilidade das microcápsulas. Assim, a matriz é escolhida tendo em conta vários aspetos como a solubilidade, a viscosidade a alto teor de sólidos, propriedades emulsificantes, capacidade de formação de filme, o campo de aplicação do composto e o custo (Özkan & Bilek, 2014; Kandansamy & Somasundaram, 2012; Gharsallaoui *et al.*, 2007). Os materiais mais usados como matriz encapsulante são gomas (como a goma-arábica), outros glúcidos de baixo peso molecular (como a maltodextrina) e proteínas (como proteínas de soja e gelatina) (Özkan & Bilek, 2014; Gharsallaoui *et al.*, 2007; Zuidam & Shimoni, 2010).

Neste trabalho, e como dito anteriormente, a matriz escolhida para o encapsulamento das betalaínas será o agar-agar, pois trata-se de uma matéria-prima de fácil acesso e de baixo custo. O agar-agar é um hidrocoloide extraído das paredes celulares de algas marinhas vermelhas (*Rhodophyceae*), sendo as espécies *Gelidium* e *Gracilaria* as mais usadas para

sua a produção. Este hidrocoloide tem aplicações, por exemplo, na indústria alimentar como aditivo alimentar, uma vez que possui propriedades gelificantes, espessantes e estabilizantes, e na microbiologia, é usado na preparação de meios de cultura sólidos (Imeson, 2010).

O agar-agar é composto por dois polissacáridos, agarose e agarpectina, e a proporção destes depende da espécie de alga da qual é extraído. A agarose é a maior fração do agar sendo também a fração gelificante. É um polímero linear composto por unidades alternadas de β -1,3 D-galactose e α -1,4 3,6-anidro-L-galactose. A agarpectina é a fração não-gelificante sendo um polissacárido mais complexo composto por agarose e diferentes grupos laterais que incluem grupos sulfato, grupos metil e ácido pirúvico (Imeson, 2010).

Como referido anteriormente, uma das propriedades do agar é a capacidade de formar géis, que se verifica a concentrações muito baixas, cerca de 0,2%. Na figura 11 está exemplificado o processo de gelificação deste polímero. O agar é insolúvel em água fria no entanto quando hidratado em água a ferver, ocorre a formação de estruturas espirais aleatórias. O processo de gelificação ocorre durante o arrefecimento (temperaturas entre 30 – 40 °C) e depende exclusivamente da formação de pontes de hidrogénio, onde as espirais se associam formando hélices individuais e duplas. Estas estruturas agregam-se para formar uma estrutura tridimensional que retém as moléculas de água no seu interior formando assim um gel termo-reversível. Uma característica importante e distinta do agar é a histerese, isto é, a diferença entre as temperaturas de gelificação e de fusão, que neste caso é muito maior (o valor ronda os 50 – 60 °C) do que o verificado noutros agentes gelificantes como o k-carragenato, no qual se verifica um valor de histeresis de 15 – 20 °C (Imeson, 2010; Belitz, Grosch & Schieberle, 2009).

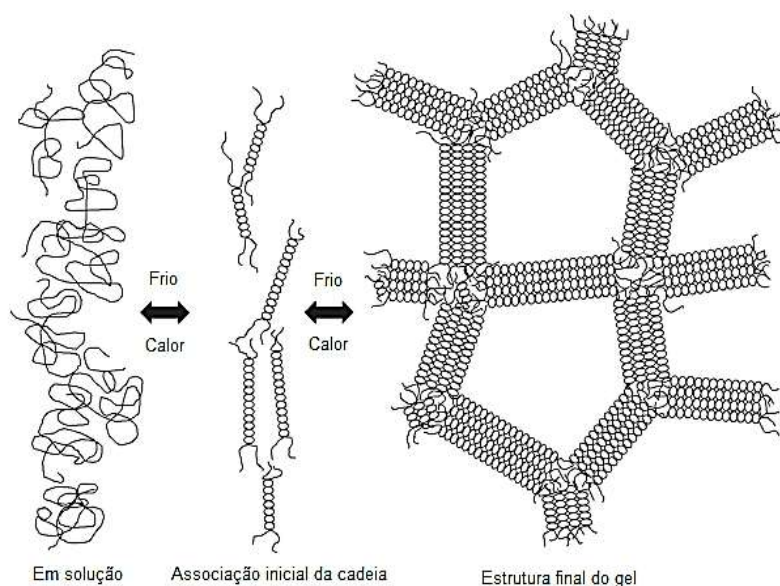


Figura 9 – Esquema de gelificação do agar-agar

Fonte: Adaptado de Imeson, 2010

2.2.4. Microencapsulamento de betalaínas

São alguns os estudos relacionados com o microencapsulamento de betalaínas provenientes da beterraba e de figo-da-índia onde o uso de matrizes encapsulantes como maltodextrina e goma-arábica é aplicado, no entanto e até ao momento, não existem estudos onde o agar-agar seja usado como matriz encapsulante. Relativamente aos métodos usados para o microencapsulamento, o *spray-dryer* é o mais comum sendo também utilizada a liofilização.

Janiszewsha (2014) realizou o microencapsulamento de extrato de beterraba por *spray-dryer* usando como matrizes encapsulantes maltodextrina, goma-arábica e uma mistura das duas na proporção 1:1. A autora observou que os corantes encapsulados em goma-arábica apresentaram o maior teor de pigmento e maior estabilidade por um longo período de tempo, devido à sua baixa higroscopicidade, em comparação com os corantes encapsulados com maltodextrina.

Num estudo realizado por Chranioti, Nikoloudaki & Tzia (2015) várias matrizes (maltodextrina, goma-arábica, amido modificado e quitosano) foram usadas na microencapsulação por liofilização de extrato de beterraba e de açafrão, tendo sido avaliados os parâmetros de cor e de adsorção de água durante um armazenamento de dez semanas à temperatura de 40 °C. Os resultados demonstraram que o tipo de matriz encapsulante usada afeta significativamente os parâmetros estudados, sendo as matrizes maltodextrina e goma-arábica as que conferem maior proteção.

Gandía-Herrero *et al.* realizaram um estudo em 2010 sobre a estabilização de indicaxantina, extraída de figos-da-índia amarelos, através da encapsulação por *spray-dryer* em maltodextrina, tendo concluído que, na ausência de luz, é possível o armazenamento deste pigmento durante meses e a 20 °C sem a ocorrência de perdas e sem variações de cor significativas.

Castro-Muñoz, Barragán-Huerta & Yáñez-Fernández (2015) procederam à microencapsulação de sumo clarificado de figo-da-índia *Opuntia stricta* por *spray-drying* utilizando várias combinações de gelatina e maltodextrina como matriz encapsulante. Os autores concluíram que o rendimento de encapsulação e as propriedades das microcápsulas dependem da proporção de gelatina-maltodextrina, sendo a melhor a de 2,5:7,5 devido ao alto rendimento obtido, melhores valores colorimétricos relacionados com o conteúdo em betalaínas e alta capacidade antioxidante.

3. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Material vegetal

Para a realização deste trabalho, as beterrabas vermelhas (*Beta vulgaris* L.) foram adquiridas num supermercado local de Lisboa no mês de maio de 2016, tendo sido produzidas em condições de agricultura biológica, segundo o rótulo do produto. As beterrabas foram armazenadas no frigorífico a 2 °C até utilização posterior. Os figos-da-índia da espécie *Opuntia stricta* (figura 10) foram colhidos na freguesia de Amieira do Tejo, em Setembro de 2015, e os da espécie *Opuntia robusta* (figura 11) foram obtidos de um produtor português do concelho de Mértola, também no mesmo mês e ano. Os frutos foram congelados até utilização posterior.



Figura 10 – Figos-da-índia da espécie *Opuntia stricta* com pormenor da cor da polpa
Fotos da autora



Figura 11 – Figos-da-índia da espécie *Opuntia robusta* com pormenor da cor da polpa
Fotos da autora

3.2. Métodos Experimentais

3.2.1. Testes preliminares para obtenção da matéria corante

As metodologias de extração sólido-líquido com viabilidade industrial foram comparadas: maceração com aplicação de temperatura e extrações assistidas por ultrassons. A realização destes testes teve como objetivo a escolha do melhor método de extração tendo em conta a sua eficiência energética.

A matéria-prima utilizada para estes testes foi a beterraba tendo sido preparada através da lavagem, descasque e corte em pequenos pedaços. A razão soluto:solvente usada foi de 1:5 e para cada ensaio pesou-se cerca de 1 g de beterraba para 5 tubos falcon e adicionou-se 5 mL de água destilada com pH = 4,63. Homogeneizou-se o preparado com um ultra-turrax T25 (IKA Labortechnik) durante 5 minutos. Os testes foram realizados em duplicado.

- **Extração assistida por ultrassons**

A extração de sólido-líquido assistida por ultrassons foi realizada fazendo variar o tempo entre 5 até 25 minutos. Os extratos foram colocados no banho de ultrassons Branson 8200, retirando-se dois extratos em intervalos de 5 minutos, colocando-os em banho de gelo. Procedeu-se à centrifugação a 3000 rpm (rotações por minuto) durante 10 minutos, numa centrífuga Sigma 202.

- **Maceração com aplicação de temperatura**

A extração de sólido-líquido através de maceração à temperatura de 40 °C foi realizada fazendo variar o tempo entre 15 até 75 minutos. Os extratos foram colocados no banho termostatizado (UNITRONIC-OR P-Selecta), retirando-se dois extratos em intervalos de 15 minutos, colocando-os em banho de gelo, procedendo depois à centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos.

- **Maceração à temperatura ambiente**

A extração de sólido-líquido através de maceração à temperatura de 18 °C foi realizada fazendo variar o tempo entre 15 até 75 minutos. Os extratos foram colocados numa placa de agitação com um ímã, retirando-se dois extratos em intervalos de 15 minutos. Colocaram-se os tubos em banho de gelo e centrifugaram-se a 3000 rpm durante 10 minutos.

Os extratos obtidos foram controlados através da determinação do teor de betalaínas totais. Os resultados obtidos encontra-se expressos no ponto 4.1. tendo-se optado pela extração através de maceração à temperatura ambiente sob agitação, durante 45 minutos.

Extração da matéria corante da beterraba vermelha e dos figos-da-índia

Uma vez definido o método de extração, realizou-se a extração da matéria corante das três matérias-primas, seguindo a relação soluto:solvente de 1:5. As matérias-primas foram trituradas na bimby entre 15 e 30 segundos realizando-se a extração segundo o método selecionado. Os extratos foram secos por liofilização num liofilizador Telstar (LyoQuest).

O extrato seco de cada matéria-prima foi analisado relativamente ao teor de betalaínas totais, teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

3.2.2. Estudo de termo e fotoestabilidade dos extratos

3.2.2.1. Termoestabilidade

A estabilidade da cor dos corantes extraídos das matrizes vegetais beterraba e figo-da-índia da espécie *Opuntia robusta* foi estudada relativamente à temperatura e ao tempo de exposição. A estabilidade da cor foi seguida durante a vida útil das misturas preparadas, seguindo a metodologia de superfícies de resposta (MSR).

O delineamento experimental teve por base uma matriz central compósita rotativa, tendo como variáveis independentes a temperatura e o tempo de exposição e como variáveis dependentes o teor de betalaínas e a cor dos extratos. Esta matriz é constituída por uma matriz fatorial, um conjunto de pontos estrela e um conjunto de repetições do ponto central. A matriz fatorial 2^k (sendo k o número de variáveis) corresponde aos pontos externos que vão definir a zona de interesse, sendo neste caso 4 pontos externos ($2^2 = 4$). Os pontos estrelas ($\pm \alpha$) são exteriores à matriz fatorial mas dentro do domínio experimental, permitindo considerar a rotatividade do delineamento, extraíndo a mesma quantidade de informação em todas as direções da superfície ajustada. Estes pontos são dois para cada variável e encontram-se à distância de $2^{k/4}$ do ponto central. Neste caso, e como tem-se duas variáveis, $\pm \alpha = \sqrt{2} = 1,41$. O ponto central (0, 0) permite estimar a variância do erro experimental devendo existir repetições deste ponto. Neste caso foram realizadas 7 repetições do ponto central.

Na tabela 1 encontra-se a matriz central compósita rotativa codificada e decodificada para os dois fatores, X_1 (tempo) e X_2 (temperatura), sendo que os estudos de termoestabilidade foram realizados de acordo com esta matriz. A temperatura a que os extratos foram expostos variou entre 50 °C e 100 °C e o tempo de exposição variou entre 0 e 120 minutos.

Tabela 1 – Matriz codificada e decodificada para o teste de termoestabilidade dos extratos de beterraba vermelha e de figo-da-índia *Opuntia Robusta*

	Ensaio	Codificada		Decodificada	
		X_1	X_2	Tempo (min)	Temperatura (°C)
Matriz Fatorial 2^k	1	-1	-1	18	57
	2	-1	1	18	93
	3	1	-1	102	57
	4	1	1	102	93
Pontos estrela $\alpha = \sqrt{2}$	5	$-\alpha$	0	0	75
	6	α	0	120	75
	7	0	$-\alpha$	60	50
	8	0	α	60	100
Pontos centrais	9	0	0	60	75
	10	0	0	60	75
	11	0	0	60	75
	12	0	0	60	75
	13	0	0	60	75
	14	0	0	60	75
	15	0	0	60	75

Foram realizadas extrações da matéria corante das matérias-primas, seguindo a relação soluto:solvente de 1:5. A beterraba foi triturada durante 5 minutos no ultra-turrax e o figo-da-índia *O. robusta* durante 30 segundos procedendo-se à extração, segundo o método selecionado no ponto 3.2.1. Uma vez obtidos os extratos, foram preparados 15 tubos de ensaio rolhados, em duplicado, para cada matéria-prima.

As soluções foram mantidas em banho termostatizado UNITRONIC-OR P-Selecta entre 50 e 100 ($\pm 0,1$) °C, na ausência de luz. Após intervalos de tempo pré-determinados, os extratos foram colocados em banho de gelo, de forma a parar a reação térmica. Os extratos foram analisados relativamente ao teor de betalainas totais e foram determinados os parâmetros de cor L^* , a^* e b^* . Todas as análises foram realizadas em duplicado.

3.2.2.2. Fotoestabilidade

A estabilidade da cor dos corantes extraídos das três matrizes vegetais, beterraba e as duas espécies de figo-da-índia, foi estudada relativamente à luz.

Foram realizadas extrações da matéria corante das três matérias-primas, seguindo a relação soluto:solvente de 1:5. A beterraba foi triturada durante 5 minutos no ultra-turrax e os figos-da-índia durante 30 segundos, procedendo-se à extração segundo o método selecionado no ponto 3.2.1. Uma vez obtidos os extratos, foram preparados 15 tubos de ensaio rolhados, em duplicado, para cada matéria-prima.

Os extratos foram mantidos numa câmara Fitoclima 750 E (Aralab) expostos à luz, durante 24 horas por dia, a uma temperatura controlada de 25 ($\pm 0,1$) °C. A intensidade luminosa foi determinada utilizando um radiómetro LI-250 A (LI-COR) com um sensor *quantum*, tendo-se obtido uma leitura de 0,087 w/m². Estes estudos tiveram a duração de 35 dias, tendo sido retirados os extratos e o duplicado no 2º, 4º, 7º, 11º, 21º, 28º e 35º dia. Os extratos foram analisados relativamente ao teor de betalaínas totais e foram determinados os parâmetros de cor L*, a* e b*. Todas as análises foram realizadas em duplicado. Também se procedeu à determinação das constantes de degradação e dos tempos de meia vida dos extratos.

3.2.3. Microencapsulamento dos extratos da beterraba e dos figos-da-índia

O microencapsulamento dos extratos da beterraba e dos figos-da-índia *Opuntia stricta* e *Opuntia robusta* foi realizado por liofilização e por *spray-dryer* tendo-se escolhido o agar-agar em pó (Absolve) como matriz encapsulante.

Foram preparados extratos das três matérias-primas de acordo com o método selecionado no ponto 3.2.1., seguindo a relação soluto:solvente de 1:5.

As soluções para o microencapsulamento por liofilização foram preparadas dissolvendo 3,45 g de agar em 25 mL de água destilada a 80 °C. Às soluções de agar foram adicionados 100 mL de extrato, reduzindo a temperatura para 40 – 50 °C. As três soluções obtidas apresentavam uma percentagem de sólidos de 3,45 % tendo sido liofilizadas num liofilizador Telstar (LyoQuest).

O extrato de beterraba também foi submetido à microencapsulação por *spray-dryer*. Dissolveu-se 13,8 g de agar em 100 mL de água destilada a 80 °C tendo sido adicionados 400 mL do extrato de beterraba, reduzindo-se a temperatura para 40 – 50 °C, obtendo-se uma solução com uma percentagem de sólidos de 3,45 %. O microencapsulamento foi realizado

num *spray-dryer* SD-05 (LabPlant) em fluxo co-corrente nas seguintes condições: fluxo de solução: 5 mL/min; fluxo de ar: 0,07; temperatura de entrada = 170 °C; temperatura de saída = 50 °C.

No final de cada processo de microencapsulamento, procedeu-se ao armazenamento dos corantes resultantes (figura 12) em frascos de vidro, dentro de um exsiccador, até análise posterior que consistiu na determinação do teor de betalaínas totais, teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante tendo-se também efetuado uma caracterização morfológica dos corantes microencapsulados.

3.2.4. Estudos para a libertação do corante a partir dos microencapsulados de beterraba e das duas espécies de figo-da-índia

Amostras (cerca de 0,5 g) de corante encapsulado foram suspensas em 10 mL de água destilada para um tubo falcon envolto em papel de alumínio. As amostras foram colocadas no frigorífico (temperatura de aproximadamente 4 °C) durante 24 horas e ao fim deste tempo procedeu-se à homogeneização no ultra-turrax durante 20 segundos para ajudar a libertação da matéria corante, e de seguida, centrifugou-se durante 10 minutos a 5000 rpm. A solução do corante libertado foi usada para determinar teor de betalaínas totais, teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

3.2.5. Métodos analíticos

3.2.5.1. Determinação do teor de betalaínas totais

A determinação do teor de betalaínas totais foi realizada espectrofotometricamente com um espectrofotómetro UV-Visível U-2010 (Hitachi), segundo Ravichandran *et al.* (2013), com algumas modificações.

Para a quantificação do teor de betacianinas e de betaxantinas, efetuou-se a leitura da absorvância a 535 e 483 nm, respetivamente. Uma vez obtidos os valores de absorvância, estes foram usados para calcular o conteúdo de betalaínas (CB) sendo a fórmula usada $CB (mg/L) = (A \times FD \times PM \times 1000) / (\epsilon \times L)$, onde A corresponde ao valor de absorvância lido; FD é o fator de diluição; PM é o peso molecular da betalaína; ϵ corresponde ao respetivo coeficiente de extinção molar e L é o comprimento da cuvete (1 cm). Os pesos moleculares (PM) e os coeficientes de extinção molar (ϵ) foram, para betacianinas e betaxantinas, 550 g/mol e 60 000 L/mol.cm, 308 g/mol e 48 000 L/mol.cm, respetivamente.

O teor de betalaínas totais corresponde à soma do teor de betacianinas e do teor de betaxantinas presente nas amostras. Os resultados são expressos em mg de betalaínas por g de amostra ou por g de matéria seca (MS).

3.2.5.2. Análise colorimétrica

A análise colorimétrica foi realizada nos extratos provenientes dos estudos de termo e fotoestabilidade, descritos nos pontos 3.2.2.1. e 3.2.2.2. respectivamente, através do sistema colorimétrico CIELab. Um determinado volume dos extratos foi colocado numa célula de um colorímetro CT-310 (Minolta) e os padrões utilizados foram o iluminante D-65 e o observador a 2°. Todas as determinações foram realizadas em triplicado.

Por leitura direta no aparelho obtiveram-se os parâmetros L^* , a^* e b^* , onde L^* representa a luminosidade da amostra e mede a variação de luminosidade entre o preto (0) e o branco (100), o parâmetro a^* define a cor vermelha para valores positivos e a cor verde para valores negativos e o parâmetro b^* define a cor amarela para valores positivos e a cor azul para valores negativos. A partir destes parâmetros calcularam-se os parâmetros h° e C^* , que correspondem à tonalidade e ao croma, respectivamente.

O croma é calculado a partir da equação 1 sendo uma medida da saturação da cor. A tonalidade pode ser definida como o ângulo (de 0° a 360°) que transmite a tonalidade da cor (nome da cor), sendo que os ângulos entre 0° e 90° correspondem aos vermelhos, laranjas e amarelos, entre 90° e 180° correspondem aos amarelos, amarelo-verdes e verdes, entre 180° e 270° correspondem aos verdes, cianos e azuis, entre 270° e 360° correspondem aos azuis, purpuras, e novamente aos vermelhos. A tonalidade é calculada a partir das equações 2, 3 e 4.

Equação 1 – Cálculo do croma (C^*)

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

Equação 2 – Cálculo da tonalidade (h°), se $a^* > 0$ e $b^* > 0$

$$h^\circ = \arctan(b^*/a^*) \times 180/\pi$$

Equação 3 – Cálculo da tonalidade (h°), se $a^* < 0$

$$h^\circ = \arctan(b^*/a^*) \times 180/\pi + 180$$

Equação 4 – Cálculo da tonalidade (h°), se $a^* > 0$ e $b^* < 0$

$$h^\circ = \arctan(b^*/a^*) \times 180/\pi + 360, \text{ se } a^* > 0 \text{ e } b^* < 0$$

As coordenadas L^* , a^* e b^* também foram convertidas para RGB, através do conversor *on-line easyrgb* (www.easyrgb.com).

3.2.5.3. Determinação das constantes de degradação e dos tempos de meia vida para os extratos nos estudos de fotoestabilidade

As leituras dos valores da absorvância, a 535 nm, dos extratos de beterraba e das duas espécies de figo-da-índia expostos à luz nos estudos de fotoestabilidade, foram usadas para obter os parâmetros que permitem estimar a estabilidade das betalaínas perante a luz.

Os valores das constantes de velocidade de degradação (K_d) foram determinados pela inclinação da reta representada pelo logaritmo neperiano da absorvância do extrato em função do tempo. A partir do K_d determinou-se o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) do extrato, ou seja, o tempo necessário para reduzir em 50 % a absorvância inicial do pigmento, obtido pela equação 5.

Equação 5 – Cálculo do tempo de meia-vida

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_d}$$

3.2.5.4. Determinação teor de compostos fenólicos

A determinação do teor dos compostos fenólicos foi realizada através do método de *Folin-Ciocalteu* segundo Čanadanović-Brunet *et al.* (2011), com algumas modificações.

A determinação dos compostos fenólicos nos extratos consistiu em adicionar 0,5 mL de amostra, 7,5 mL de água destilada, 0,5 mL de reagente de *Folin-Ciocalteu* (Merck) e 1,5 mL de solução de Na_2CO_3 (Hopkin & Williams) a 20%. Para a preparação do branco adicionou-se 8 mL de água destilada, 0,5 mL de reagente de *Folin-Ciocalteu* e 1,5 mL solução de Na_2CO_3 a 20%. Agitou-se cada tubo de ensaio no vortex e colocou-se no escuro durante 2 horas. Ao fim deste tempo procedeu-se à leitura das absorvâncias no espectrofotómetro a 750 nm. O teor de compostos fenólicos é calculado recorrendo à equação da reta de

calibração $y = 88,003x + 0,0288$ (Anexo I), sendo expresso em mg de ácido gálico por g de MS. Todas as determinações foram realizadas em quadruplicado.

3.2.5.5. Determinação da capacidade antioxidante

Para a determinação da capacidade antioxidante das amostras utilizaram-se dois métodos, o método de redução do íon de ferro (FRAP) segundo Benzie & Strain (1996) e o método de captação de radicais livres DPPH segundo Yeddes *et al.* (2013), com algumas modificações.

- **Método de redução do íon ferro (*Ferric ion reducing antioxidant power* – FRAP)**

A determinação da capacidade antioxidante através do método FRAP consistiu em adicionar 0,2 mL de extrato e 1,8 mL da solução FRAP preparada da seguinte forma: 3,75 mL da solução 3; 3,75 mL da solução 4 e 37,5 mL da solução 2 (Anexo III). Para a preparação do branco adicionou-se 0,4 mL de água destilada e 3,6 mL da solução de FRAP. Agitou-se cada tubo de ensaio no vortex e colocou-se no escuro durante 5 minutos. Ao fim deste tempo procedeu-se à leitura das absorvâncias no espectrofotómetro a 593 nm. A atividade antioxidante é calculada recorrendo à equação da curva de calibração $y = 0,0213x - 0,0057$ (Anexo II), sendo expresso em μmol de Fe^{2+} por g de MS. Todas as determinações foram realizadas em quadruplicado.

- **Método de captação de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)**

Para a determinação da capacidade antioxidante nos extratos, preparou-se a solução de DPPH, pesando 40 mg de reagente DPPH (Sigma-Aldrich) e dissolvendo com solução de etanol (Carlo Erba Reagents) a 95 % (v/v) em balão volumétrico de 100 mL, resultando deste modo uma solução de concentração 0,1 mM.

Para cada extrato prepararam-se 6 diluições de concentrações diferentes em balão de 1 mL, como indicado na tabela 2. A preparação dos tubos de ensaio para a leitura das absorvâncias consistiu em colocar 100 μL de cada solução anteriormente preparada (amostra e as 6 diluições) num tubo de ensaio, devidamente identificado, e adicionar 2 mL da solução de DPPH 0,1 mM, tendo-se efetuado triplicados. Preparou-se o branco de etanol (num tubo de ensaio colocou-se 200 μL de água destilada e 4 mL de etanol a 95 % (v/v)) e o branco do DPPH (num tubo de ensaio colocou-se 100 μL de água destilada e 2 mL de DPPH). Procedeu-se à agitação de cada tubo no vórtex e de seguida, colocou-se no escuro durante 1 hora. Ao fim deste tempo, efetuou-se a leitura das absorvâncias a 517 nm.

A capacidade dos antioxidantes dos extratos em captar os radicais livres de DPPH é expressa pela percentagem de inibição do DPPH, dada pela equação 6, sendo que quanto maior for esta inibição, maior será a atividade antioxidante. A concentração de extrato necessária para inibir a oxidação do radical em 50%, definida como EC₅₀, é determinada a partir da equação da curva do gráfico da concentração em função da inibição de DPPH, sendo expresso em mg por mL.

Tabela 2 – Esquema das diluições para o método DPPH

Diluição	Quantidade de amostra (µL) em balão volumétrico de 1 mL
1/2	500
1/5	200
1/10	100
1/20	50
1/40	25
1/100	10

Equação 6 – Cálculo da percentagem de inibição do DPPH

$$\text{Inibição do DPPH (\%)} = \frac{\text{Abs Branco do DPPH} - \text{Abs Amostra}}{\text{Abs Branco do DPPH}} \times 100$$

3.2.5.6. Caracterização morfológica dos microencapsulados por microscopia eletrônica de varrimento (*Scanning Eletron Microscopy* - SEM)

Os microencapsulados dos extratos de beterraba vermelha e dos figos-da-índia *Opuntia stricta* e *Opuntia robusta* obtidos pelos processos de liofilização e *spray-drying* foram observados através da técnica de microscopia eletrônica de varrimento, do inglês *scanning electron microscopy* (SEM), com o objetivo de analisar a morfologia das microcápsulas.

O procedimento consistiu em revestir as amostras com um banho de ouro (uma mistura de 95 % ouro com 5 % paládio) num *sputter coated* Polaron E5350, de forma a preservar a superfície da amostra e de a tornar condutora, aumentando o sinal, possibilitando assim a análise por SEM. O aparelho utilizado para observação e obtenção de imagens foi um microscópio eletrônico de varrimento JEOL JSM-5410, com uma voltagem de aceleração de

10 kV. As imagens obtidas em formato digital foram tratadas pelo *software* SEM-AFORE v. 5.0.

3.2.6. Análise estatística dos resultados

Os resultados do estudo da termoestabilidade dos extratos foram analisados utilizando o *software* Statistica v.8 (Statsoft, EUA). Os dados do teor de betalaínas totais e da cor dos extratos foram ajustados a equações polinomiais de segundo grau (equação 7) através de uma regressão linear múltipla, segundo o critério dos mínimos quadrados, para descrever os efeitos lineares, quadráticos e das interações das variáveis.

Equação 7 – Equação polinomial de segundo grau

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_{11}X_1^2 + b_2X_2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2$$

Y – variável dependente (teor de betalaínas totais/cor)

X₁ e X₂ – variáveis independentes (tempo e temperatura, respetivamente)

b₁ e b₂ – coeficientes lineares

b₁₁ e b₂₂ – coeficientes quadráticos

b₁₂ – coeficiente linear da interação X₁ e X₂

Para avaliar a qualidade dos modelos foram tidos em conta os coeficientes de regressão múltipla: o coeficiente de determinação (R²) e o coeficiente de determinação ajustado (R²_{ajustado}). O R², sendo R o coeficiente de correlação entre as variáveis independentes, varia entre 0 e 1, e quanto mais próximo estiver de 1, mais o modelo se ajusta aos dados experimentais. O R²_{ajustado} também varia entre 0 e 1 e é sempre inferior ao R², devendo também encontrar-se o mais próximo de 1, para que se possa afirmar que o modelo se ajusta à realidade. A diferença entre estes coeficientes deve ser menor que 0,1.

Os resultados dos estudos da fotoestabilidade e da caracterização dos extratos antes e depois de microencapsulados foram submetidos a um tratamento estatístico, através da análise de variância (ANOVA) utilizando o *software* Statistica v.8 (Statsoft, EUA). O teste de Tuckey foi usado para a comparação de médias ($p < 0,05$) com um nível de confiança de 95 %.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Testes preliminares para obtenção da matéria corante

Na figura 12 estão apresentados os resultados da extração assistida por ultrassons e verifica-se que o teor de betalaínas totais aumenta à medida que o tempo aumenta, atingindo-se um máximo de 1,26 mg/ g de beterraba ao fim de 15 minutos, sendo que este valor diminuiu ao fim de 20 e 25 minutos.

Relativamente aos resultados da extração com banho termostatzado à temperatura de 40 °C (figura 13) observa-se um aumento do teor de betalaínas totais ao longo do tempo, atingindo-se um máximo de 1,12 mg/g de beterraba ao fim de 75 minutos.

Na figura 14 é possível observar os resultados da extração à temperatura ambiente sob agitação, verificando-se que, ao fim de 45 minutos, se atinge um máximo de 0,99 mg/g de beterraba.

Uma vez realizadas as três extrações e analisados os resultados, o método de extração escolhido para a realização deste trabalho foi o da extração por maceração à temperatura ambiente sob agitação. Apesar de este não ser o método onde se atinge o maior teor de betalaínas totais, é aquele que aparenta ser o mais ecológico a nível energético.

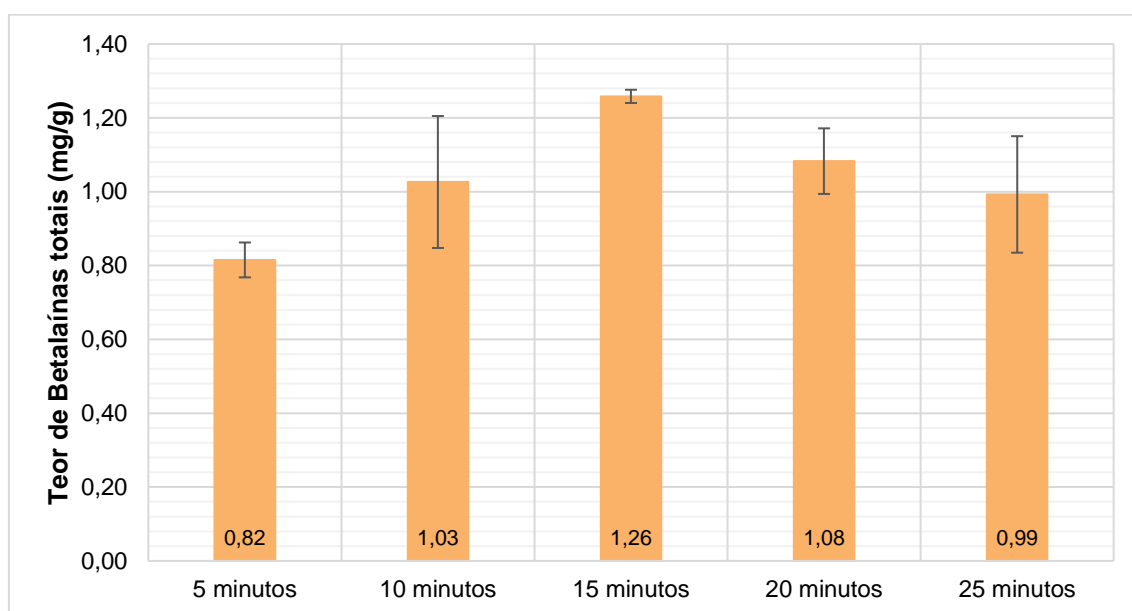


Figura 12 – Teor de betalaínas totais na extração da matéria corante da beterraba vermelha assistida por ultrassons. Valores médios \pm desvio-padrão

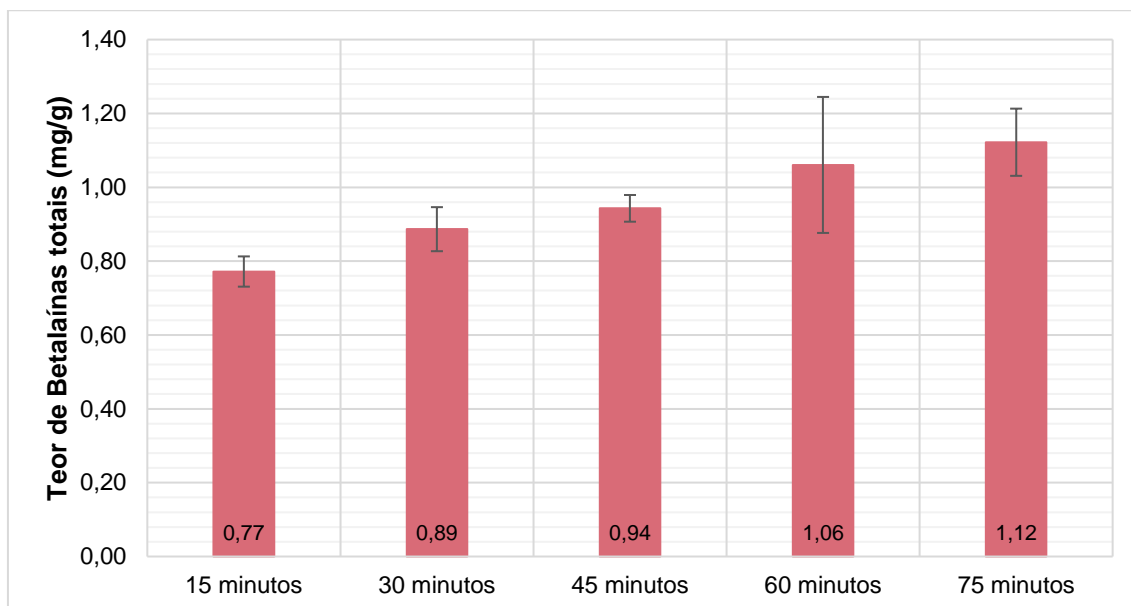


Figura 13 – Teor de betalaínas totais na extração da matéria corante da beterraba vermelha por maceração em banho termostatzado (T=40 °C). Valores médios \pm desvio-padrão

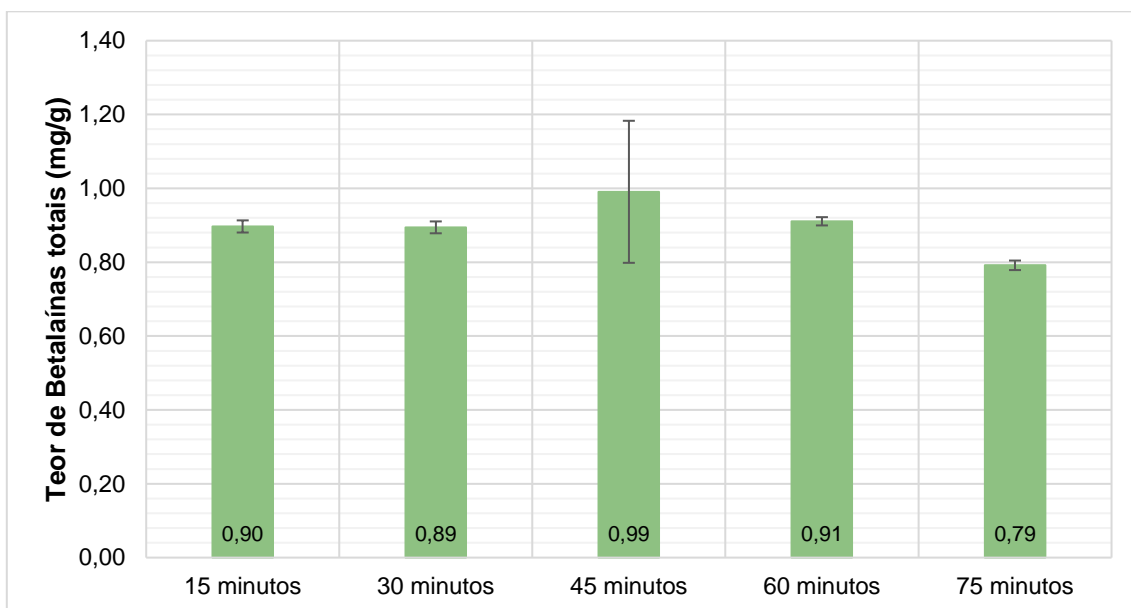


Figura 14 – Teor de betalaínas totais na extração da matéria corante da beterraba vermelha por maceração à temperatura ambiente sob agitação (T=18 °C). Valores médios \pm desvio-padrão

4.2. Estudos de termo e fotoestabilidade dos extratos

Os estudos de termo e fotoestabilidade dos corantes extraídos das três matrizes vegetais (beterraba e as duas espécies de figo-da-índia) tiveram como objetivo perceber qual o impacto

dos fatores associados (temperatura, luz e tempo) sobre a estabilidade das betalaínas e da cor, de forma a concluir se se justifica, ou não, o microencapsulamento dos mesmos.

4.2.1. Termoestabilidade

Os resultados obtidos destes estudos encontram-se no anexo IV deste trabalho, tendo sido sujeitos a uma análise pela metodologia de superfícies de resposta pelo programa *Statistica* 8.0 (StatSoft, EUA).

Na tabela 3 são apresentadas as equações ajustadas dos modelos e, de uma forma geral, os modelos obtidos foram bem ajustados aos dados experimentais. Pelas equações verifica-se que, no caso do extrato de beterraba, a temperatura linear, o tempo linear e quadrático, apresentam um impacto significativo no teor de betalaínas totais, sendo que a temperatura linear e o tempo linear têm um impacto negativo, resultando na diminuição do teor de betalaínas totais. Relativamente ao extrato do figo-da-índia da espécie *O. robusta* apenas a temperatura linear apresenta um impacto significativo, sendo este negativo. Relativamente à cor, em ambos os extratos, apenas a temperatura linear e o tempo linear apresentam um impacto significativo sobre esta variável. O extrato do figo-da-índia apresenta valores dos efeitos mais elevados, indicando que a temperatura e o tempo de exposição têm maior impacto sobre a cor deste extrato do que no da beterraba.

Tabela 3 – Equações ajustadas pela MSR para o teor de betalaínas totais e análise colorimétrica (parâmetro h°) dos extratos de beterraba vermelha e de figo-da-índia *Opuntia robusta*

		R^2	R^2_{ajustado}	Equação polinomial do modelo
Teor de betalaínas totais (mg/g)	Beterraba vermelha	0,957	0,933	$0,50 - 0,48T - 0,32t + 0,16t^2$
	<i>Opuntia robusta</i>	0,845	0,759	$0,35 - 0,24T$
Análise colorimétrica (parâmetro h°)	Beterraba vermelha	0,778	0,654	$27,13 + 5,56T + 4,63t$
	<i>Opuntia robusta</i>	0,852	0,769	$45,11 + 22,08T + 16,60t$

T – temperatura; t - tempo

Na figura 15 estão apresentadas as respectivas superfícies de resposta, correspondentes ao teor de betalaínas totais e à cor nos dois extratos, em função da temperatura e do tempo de exposição. Para o extrato de beterraba observa-se uma diminuição do teor de betalaínas totais em função da temperatura e do tempo de exposição, ocorrendo uma diminuição de aproximadamente 78 % do teor inicial (teor inicial de 0,99 mg/g e teor final de 0,22 mg/g). Para o extrato de figo-da-índia, também ocorre uma diminuição, sendo esta cerca de 66 % (teor inicial de 0,52 mg/g e teor final de 0,18 mg/g), no entanto a temperatura é a variável com mais impacto. Relativamente à cor dos extratos observa-se um aumento da tonalidade nos dois extratos, em função da temperatura e do tempo de exposição, sendo este maior no extrato do figo-da-índia (aumento de 127 %) do que para o extrato de beterraba (aumento de 39 %), indicando desta forma uma maior alteração na cor do extrato do figo-da-índia.

Os resultados da análise colorimétrica foram convertidos para coordenadas RGB obtendo-se os resultados da tabela 4. Como visto anteriormente, o teor de betalaínas totais diminui ao longo dos estudos em ambos os extratos, no entanto, verifica-se que a cor do extrato de beterraba mantém-se praticamente inalterada, ao contrário do extrato do figo-da-índia, onde se verifica uma mudança de cor evidente para binómios de tempo/temperatura maiores, passando de vermelho para tonalidades mais próximas do amarelo. Rosário *et al.* (2015) estudaram a termoestabilidade do extrato do figo-da-índia da espécie *Opuntia stricta* e da beterraba vermelha, tendo também verificado que à medida que a temperatura e o tempo de exposição aumentam, o teor de betalaínas totais diminui e os extratos perdem a sua cor original. Apesar da cor do extrato de beterraba se manter praticamente inalterada, seria de esperar que ocorresse também uma degradação idêntica ao do figo-da-índia. Num estudo realizado por Fernández-Lopez *et al.* (2013), os autores concluíram que os extratos de beterraba vermelha e de figo-da-índia são os mais termossensíveis dos seis extratos analisados, nos quais se incluem extratos antociânicos de couve roxa e de bagas de sabugueiro.

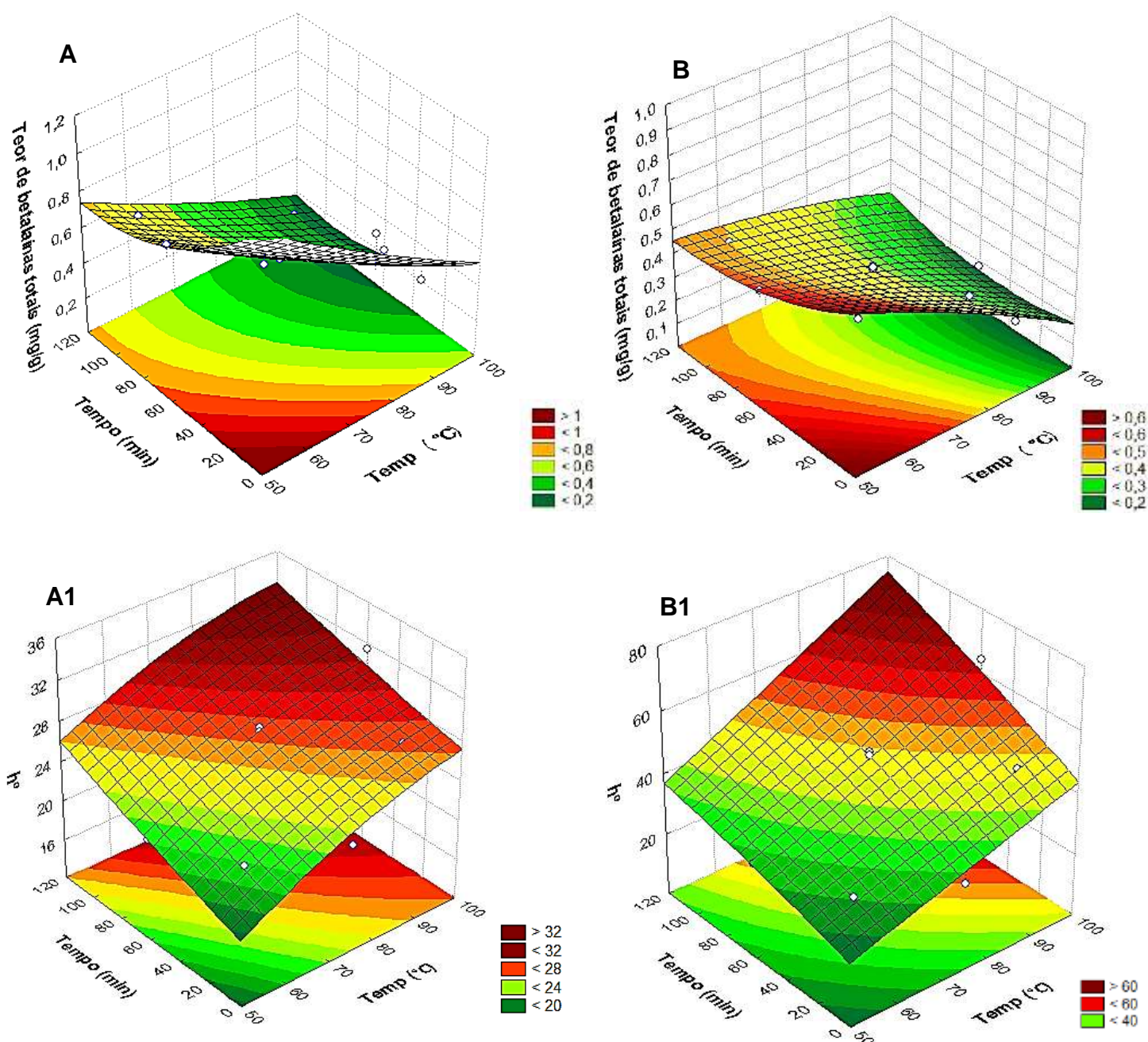

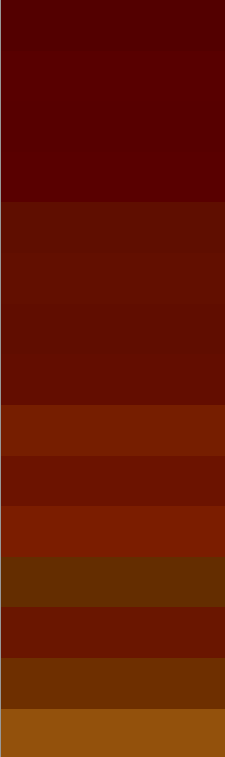


Figura 15 – Superfícies de resposta para o teor de betalaínas totais e cor (parâmetro h°) nos extratos de beterraba vermelha (A e A1) e de figo-da-índia *Opuntia robusta* (B e B1) em função do tempo e da temperatura

Tabela 4 – Resultados da análise colorimétrica em RGB dos extratos de beterraba vermelha e de figo-da-índia *Opuntia robusta* nos estudos de termoestabilidade

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Beterraba vermelha	<i>Opuntia robusta</i>
1	75	0		
2	50	60		
3	57	18		
4	57	102		
5	75	60		
6	75	60		
7	75	60		
8	75	60		
9	75	60		
10	75	60		
11	75	60		
12	75	120		
13	93	18		
14	93	102		
15	100	60		

4.2.2. Fotoestabilidade

Os resultados relativos ao teor de betalaínas totais e análise colorimétrica obtidos nestes estudos são apresentados na figura 16 e figuras 17, 18 e 19, respetivamente. Por observação da figura 16 constata-se que, de um modo geral, a luz tem impacto na estabilidade dos pigmentos dos três extratos, causando a sua degradação. O extrato de beterraba apresenta menor estabilidade à luz, sendo que ao fim de 7 dias o seu teor de betalaínas totais diminuiu de 0,63 para 0,13 mg/g, correspondendo a uma diminuição de cerca de 79 % do valor inicial. Os extratos dos figos-da-índia *O. robusta* e *O. stricta* exibem uma maior estabilidade, apresentando um teor de betalaínas totais inicial de 0,57 e 0,27 mg/g, e ao fim de 35 dias de exposição à luz apresentam um teor de 0,05 e 0,03 mg/g, respetivamente, o que corresponde a uma diminuição em cerca de 90 %.

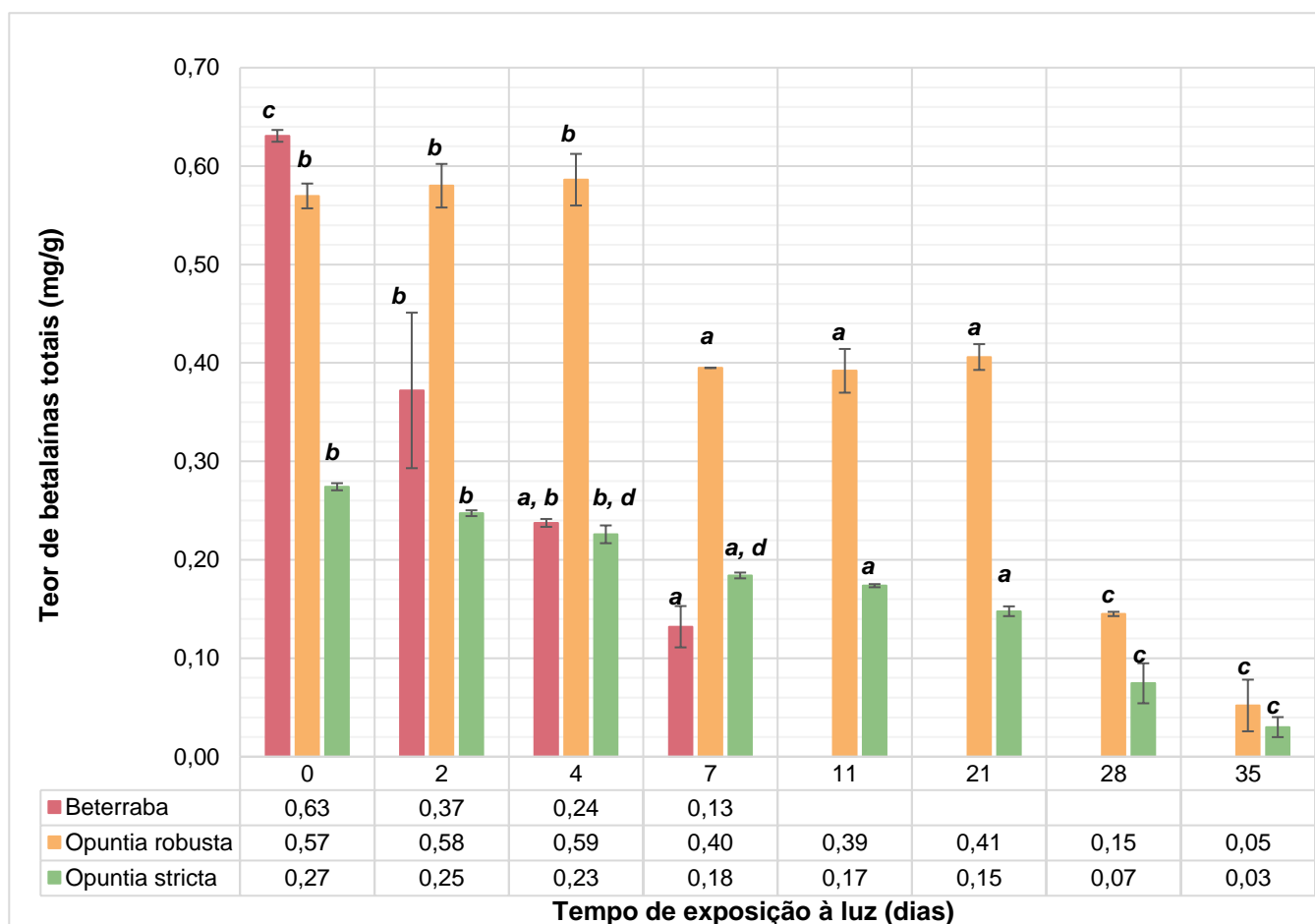


Figura 16 – Teor de betalaínas totais dos extratos de beterraba vermelha e dos figos-da-índia *Opuntia stricta* e *Opuntia robusta* nos estudos de fotoestabilidade. Valores médios \pm desvio-padrão. Para cada matéria-prima, letras diferentes indicam diferenças significativas entre os valores médios ($p < 0,05$)

No que respeita à análise colorimétrica dos três extratos durante estes estudos (figuras 17, 18 e 19) verifica-se uma diminuição dos valores da tonalidade (h^0) e um aumento dos valores da luminosidade (L^*), no entanto estas variações são mais acentuadas nos últimos dias do ensaio. As variações são maiores para o extrato do figo-da-índia da espécie *O. robusta*, onde se observa uma diminuição da tonalidade em cerca de 92 % e um aumento da luminosidade em cerca de 345 %. Para o extrato do figo-da-índia *O. stricta* verifica-se uma diminuição de 41 % da tonalidade e um aumento de 105 % da luminosidade. Para a beterraba, a tonalidade do extrato diminuiu em 68 % e a luminosidade aumentou em 97 %.

Na tabela 5 são apresentados os resultados da análise colorimétrica em RGB onde se observa a alteração da cor dos extratos ao longo do ensaio de fotoestabilidade, o que é coerente com a diminuição do teor de betalaínas totais. Observa-se que, para a beterraba, esta perde a sua cor vermelha característica ao fim de 7 dias de exposição à luz, adquirindo um tom castanho-

amarelado. Para os extratos dos figos-da-índia, estes perdem a sua cor característica ao fim de 35 dias de exposição, adquirindo tonalidades próximas do amarelo.

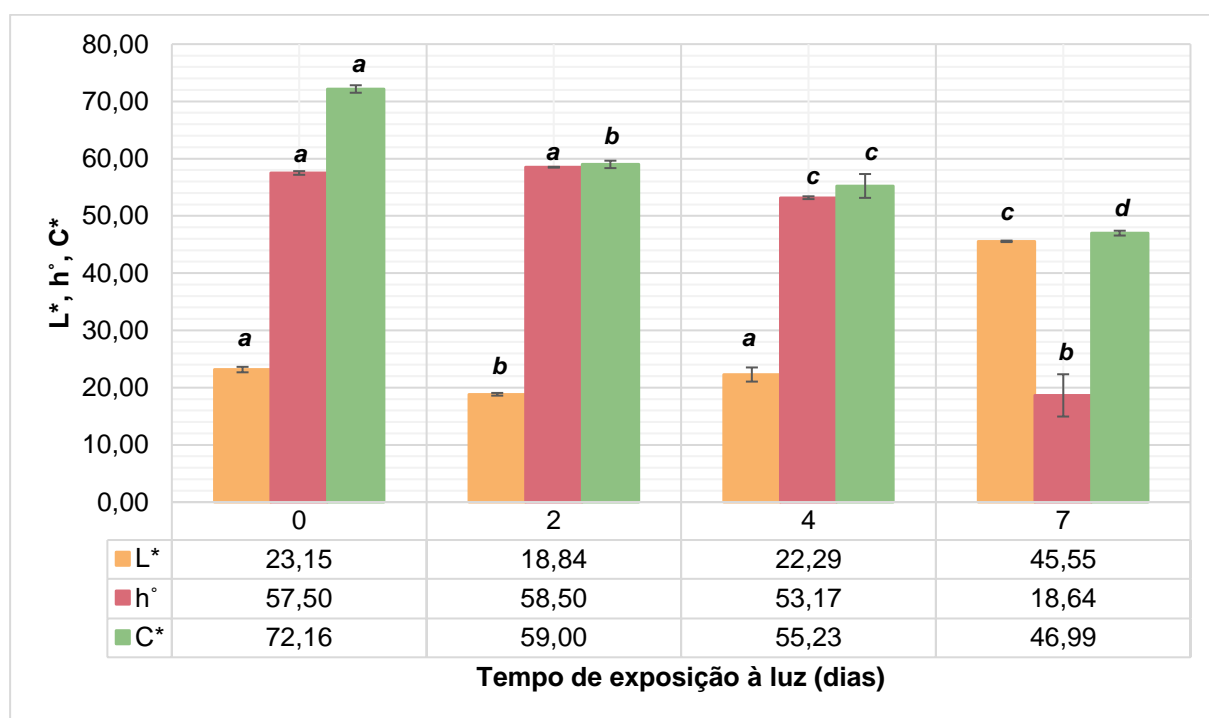


Figura 17 – Análise colorimétrica do extrato de beterraba vermelha nos estudos de fotoestabilidade. Valores médios \pm desvio-padrão. Para cada parâmetro, letras diferentes indicam diferenças significativas entre os valores médios ($p < 0,05$)

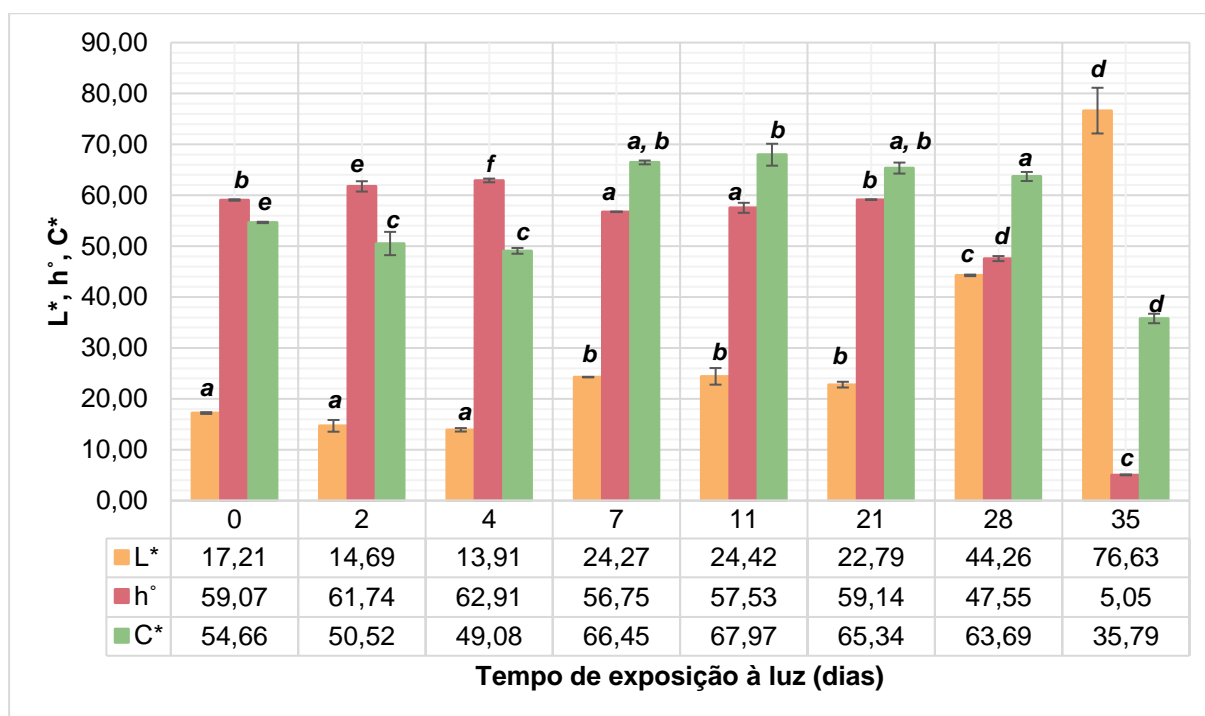


Figura 18 – Análise colorimétrica do extrato de figo-da-índia *Opuntia robusta* nos estudos de fotoestabilidade. Valores médios \pm desvio-padrão. Para cada parâmetro, letras diferentes indicam diferenças significativas entre os valores médios ($p < 0,05$)

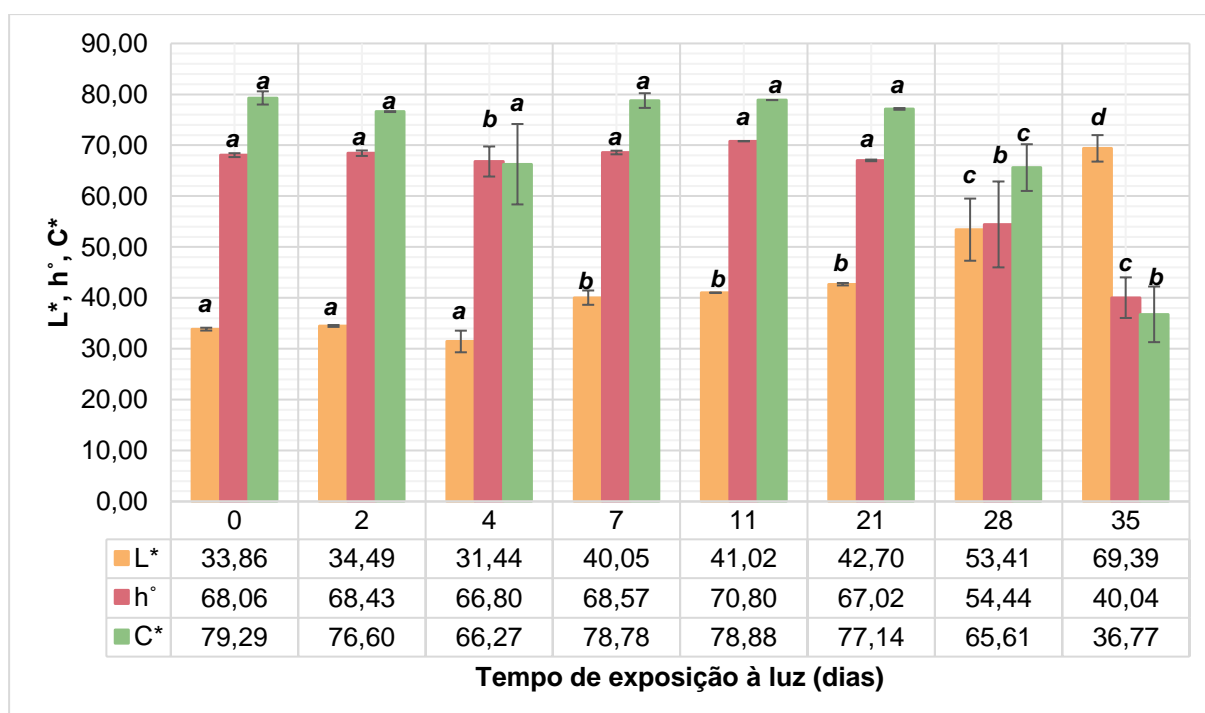






















Figura 19 – Análise colorimétrica do extrato de figo-da-índia *Opuntia stricta* nos estudos de fotoestabilidade. Valores médios \pm desvio-padrão. Para cada parâmetro, letras diferentes indicam diferenças significativas entre os valores médios ($p < 0,05$)

Tabela 5 – Resultados da análise colorimétrica em RGB obtidos nos estudos de fotoestabilidade dos extratos de beterraba vermelha e dos figos-da-índia *Opuntia stricta* e *Opuntia robusta*

Tempo de exposição (dias)	Beterraba vermelha	<i>Opuntia stricta</i>	<i>Opuntia robusta</i>
0			
2			
4			
7			
11	-		
21	-		
28	-		
35	-		

Os valores de absorvância dos extratos de beterraba e dos figos-da-índia *O. stricta* e *O. Robusta* foram usados para construir os gráficos representando a degradação das betalaínas expostas à luz, bem como suas respectivas equações e valores de contante de degradação (K_d) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$) sendo ilustrados na figura 20 e na tabela 6, respetivamente. Para os extratos de beterraba e do figo-da-índia *O. robusta* do ensaio de termoestabilidade não foi possível determinar os valores de K_d e $t_{1/2}$, uma vez que o desenho experimental não se adequou a um modelo que descrevesse o processo de degradação das betalaínas.

Pelos valores de K_d e de $t_{1/2}$, visualizados na tabela 6, percebe-se a influência da luz sobre as betalaínas ao longo do tempo. O tempo de meia vida obtido para os extratos dos figos *O. stricta* e *O. robusta* e da beterraba, ou seja, o tempo necessário para degradar 50 % das betalaínas na presença de luz foi de 13, 11 e 3 dias, respetivamente. O extrato do figo *O. stricta* apresentou um tempo de meia vida superior aos extratos de *O. robusta* e de beterraba, revelando uma maior estabilidade à luz. Os resultados obtidos mostram que, em cerca de 3 dias, ocorreu uma rápida degradação das betalaínas da beterraba.

Ao observar os dados obtidos (tabela 6) verifica-se que quanto maior for o tempo de exposição à luz, menor a constante de degradação e, conseqüentemente, maior o tempo de meia vida das betalaínas dos extratos.

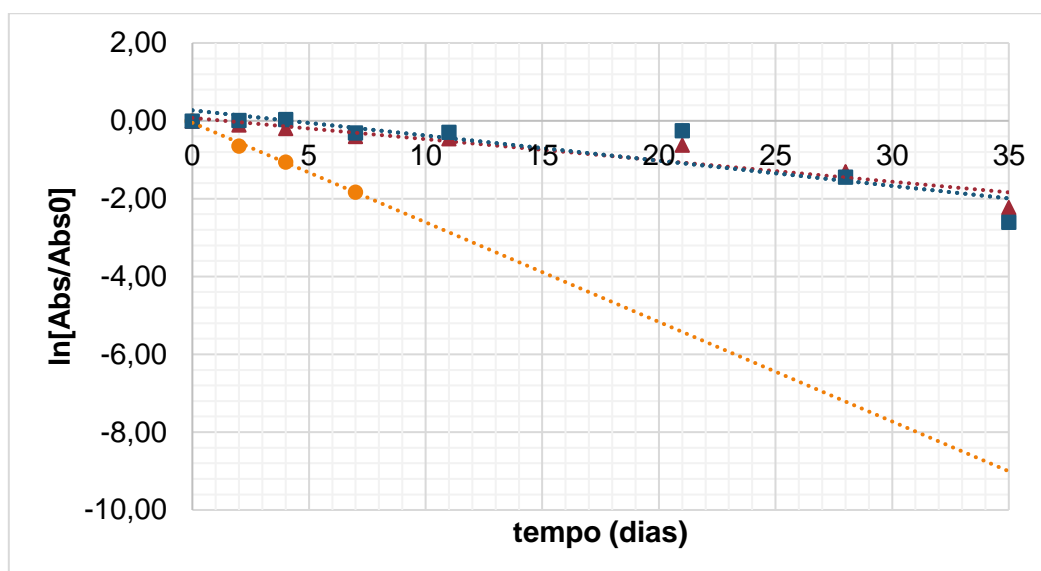


Figura 20 – Representação gráfica da relação linear de $\ln[\text{Abs}/\text{Abs}_0]$ em função do tempo para os extratos de beterraba (círculos amarelos) e dos figos-da-índia *Opuntia stricta* (triângulos vermelhos) e *Opuntia robusta* (quadrados azuis) e as respectivas retas de regressão

Tabela 6 – Equações de regressão, coeficiente de regressão (r^2) e valores da constante de velocidade de degradação (K_d) e do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) ao longo do tempo de exposição à luz dos extratos de beterraba e dos figos-da-índia *Opuntia stricta* e *Opuntia robusta*

Extrato	Equação da reta	K_d	$t_{1/2}$ (dias)
Beterraba	$\ln[\text{Abs}/\text{Abs}_0] = -0,2559x - 0,0502$ $r^2=0,9944$	0,2559	3
<i>O. stricta</i>	$\ln[\text{Abs}/\text{Abs}_0] = -0,0547x + 0,0758$ $r^2=0,8968$	0,0547	13
<i>O. robusta</i>	$\ln[\text{Abs}/\text{Abs}_0] = -0,0647x + 0,2684$ $r^2=0,8033$	0,0647	11

4.3. Caracterização dos extratos antes e depois de microencapsulados

Caracterização dos extratos de beterraba vermelha e dos figos-da-índia antes e depois de microencapsulados por liofilização

Os estudos de termo e fotoestabilidade dos extratos permitiram concluir que os fatores temperatura, luz e tempo causam degradação das betalaínas, procedendo-se à microencapsulação dos extratos das matérias-primas, tendo-se caracterizado os mesmos antes e depois da microencapsulação, relativamente ao teor de betalaínas, da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos.

Na figura 21 são apresentados os resultados do teor de betalaínas, onde se verifica que, das três matérias-primas, o extrato de beterraba é o que apresenta maior teor de betalaínas totais (8,95 mg/g de MS sendo que 5,31 mg correspondem a betacianinas e os restantes 3,64 mg a betaxantinas), o que é concordante com os resultados obtidos por Castellanos-Santiago & Yahia (2008) (8,60 mg de betalaínas totais/g de MS; 5,41 mg/g de betacianinas/g de MS; 3,21 mg de betaxantinas/g de MS). No extrato de figo-da-índia da espécie *O. robusta* obteve-se um teor de betalaínas totais de 4,34 mg/g de MS, verificando-se um perfil de betalaínas semelhante ao da beterraba, com uma maior quantidade de betacianinas (2,53 mg/g de MS) do que betaxantinas (1,81 mg/g de MS). Estes resultados são inferiores aos obtidos, também por Castellanos-Santiago & Yahia (2008), para a variedade Camuesa (*O. robusta*) cujo teor de betalaínas totais determinado foi de 8,15 mg/g de polpa seca, o que se assemelha bastante ao teor da beterraba. Esta diferença de resultados poderá estar relacionada com diversos fatores como as condições edafoclimáticas, o estado de maturação dos frutos assim como a distribuição das betalaínas pelas diferentes partes do fruto (Sáenz *et al.*, 2012). Relativamente ao extrato do figo-da-índia da espécie *O. stricta*, apenas se detetou betacianinas, como era de esperar, tendo-se obtido um teor de 3,03 mg/g de MS.

Analisando os resultados obtidos depois da microencapsulação, verifica-se uma diminuição de 47 % no teor de betalaínas totais no extrato de beterraba (obteve-se um teor de 4,75 mg/g de MS), no entanto para os figos-da-índia a diminuição não é tão acentuada (cerca de 27 % e 12 % para os extratos de *O. robusta* e *O. stricta*, respetivamente) não havendo diferenças significativas entre estes. Isto pode ser explicado pela presença de compostos da polpa dos figos-da-índia (mucilagem e fibras) que ajudem no processo de encapsulamento, havendo uma maior retenção do pigmento (Saénz *et al.*, 2009; Otálora *et al.*, 2015). Na figura 22 é visível a diferença de cor entre extrato de beterraba liofilizado e microencapsulado por liofilização, havendo claramente uma diminuição da matéria corante.

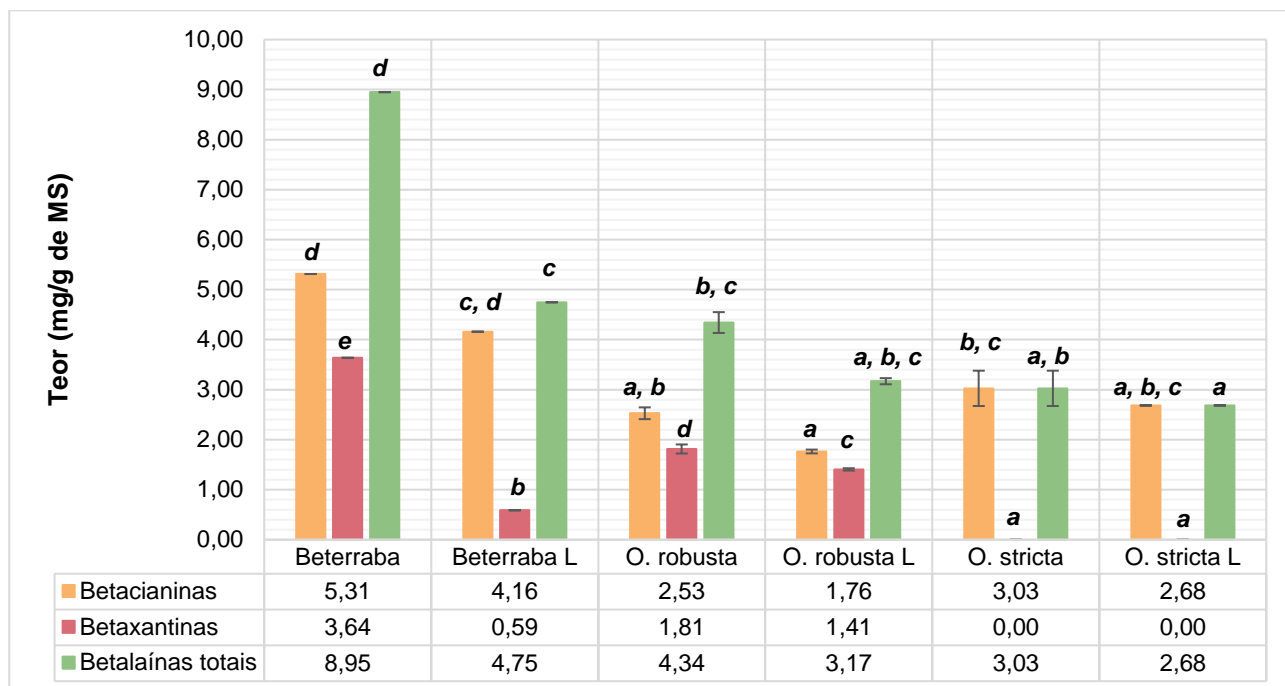


Figura 21 – Teor de betalaínas dos extratos de beterraba vermelha e dos figos-da-índia *Opuntia stricta* e *Opuntia robusta* antes e depois de microencapsulados por liofilização (L). Valores médios \pm desvio-padrão. Para cada parâmetro, letras diferentes indicam diferenças significativas entre os valores médios ($p < 0,05$)



Figura 22 – Extrato de beterraba liofilizado (A) e microencapsulado em agar-agar por liofilização (B)

Para a determinação da atividade antioxidante dos extratos recorreu-se a dois métodos, uma vez que não existe um método oficial.

Os resultados obtidos pelo método DPPH (figura 23) permitem verificar que os extratos antes da microencapsulação apresentam menores valores de EC_{50} que os extratos depois de microencapsulados. Isto indica uma perda da atividade antioxidante com a microencapsulação pois quanto maior for um valor de EC_{50} , menor será a atividade antioxidante do extrato. Apesar dos valores de EC_{50} dos extratos antes da microencapsulação não apresentarem diferenças significativas em si, o extrato do figo-da-índia *O. stricta* é o que apresenta maior atividade antioxidante com um valor de 5,74 mg/mL, seguido da beterraba e do figo *O. robusta*, com valores de 10,51 e 12,66 mg/mL, respetivamente. Com a microencapsulação os resultados aumentaram 489 % para o extrato do figo *O. stricta*, 531 % para o extrato de beterraba e 509 % para o extrato do figo *O. robusta*, obtendo-se valores de EC_{50} de 33,78, 66,28 e 77,12 mg/mL, respetivamente.

Na figura 24 apenas são apresentados os resultados obtidos da atividade antioxidante determinada pelo método FRAP para os extratos dos figos-da-índia uma vez que não foi possível realizar esta determinação para o extrato de beterraba. Analisando os resultados verifica-se uma coerência com os do método DPPH, nomeadamente uma perda de atividade antioxidante com a microencapsulação. Inicialmente os extratos dos figos-da-índia *O. stricta* e *O. robusta* apresentam valores de 13,51 e 7,6 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ de MS, respetivamente, sendo que o extrato do figo *O. stricta* é o que apresenta maior atividade antioxidante, estando de acordo com os resultados obtidos pelo método DPPH. Com a microencapsulação observa-se uma diminuição de 86 % e 84 %, respetivamente, obtendo-se valores de FRAP de 1,93 e 1,19 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ de MS.

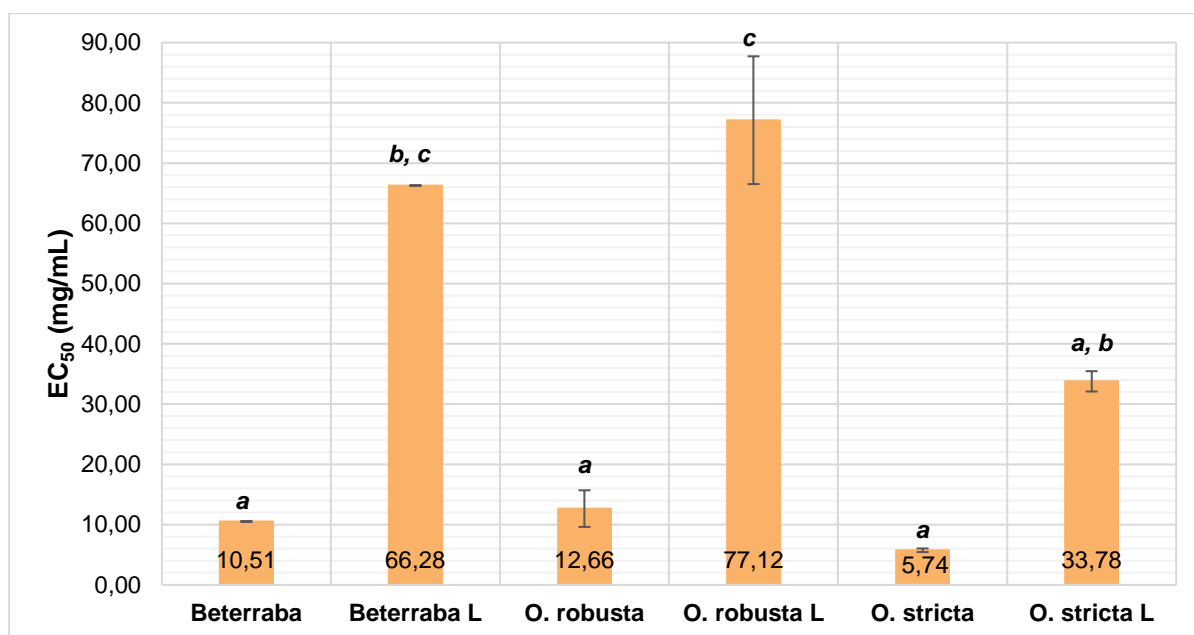


Figura 23 – Atividade antioxidante (método DPPH) nos extratos de beterraba vermelha e dos figos-da-índia *Opuntia stricta* e *Opuntia robusta* antes e depois de microencapsulados por liofilização. Valores médios \pm desvio-padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os valores médios ($p < 0,05$)

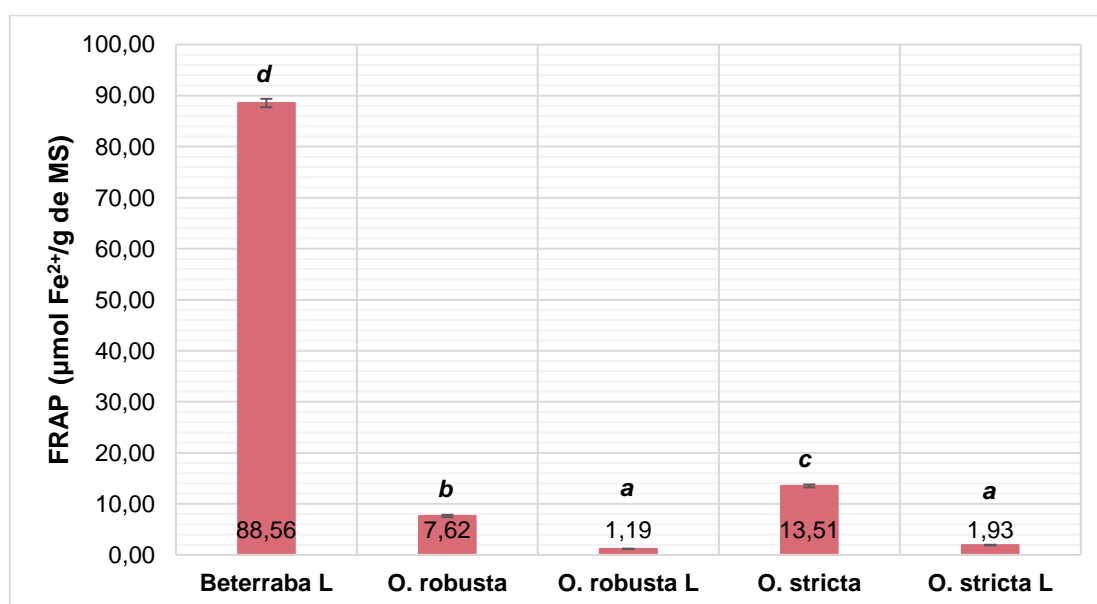


Figura 24 – Atividade antioxidante (método FRAP) dos extratos de beterraba e figos-da-índia *Opuntia stricta* e *Opuntia robusta* antes e depois de microencapsulados por liofilização (L). Valores médios \pm desvio-padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os valores médios ($p < 0,05$)

Os resultados obtidos para o teor de compostos fenólicos nos três extratos são apresentados na figura 25, sendo o extrato do figo-da-índia *O. stricta* o que possui o maior teor, com 92,87 mg AG/g de MS. Os extratos do figo *O. robusta* e da beterraba apresentam o segundo maior e o menor teor de compostos fenólicos, com 69,13 e 50,00 mg AG/g de MS, respetivamente. Estes resultados são coerentes com os obtidos na atividade antioxidante determinada pelo método DPPH, pois os compostos fenólicos são conhecidos por terem capacidade de captar radicais livres.

Como referido anteriormente, com a microencapsulação verifica-se uma diminuição da atividade antioxidante, no entanto observa-se que nos extratos do figo *O. stricta* e da beterraba ocorreu um ligeiro aumento do teor de compostos fenólicos depois da microencapsulação (3,8 % e 13,2 %, respetivamente), não existindo, para cada extrato, diferenças significativas entre os valores de antes e depois da microencapsulação. Isto poderá indicar a existência de outros compostos que tenham capacidade de captar radicais livres mas que não se tenham conseguido extrair com a reidratação dos microencapsulados, explicando assim a diminuição da atividade antioxidante. Como referido no ponto 3.2.3 deste trabalho, a reidratação foi realizada durante 24 horas usando água destilada como solvente, ao abrigo da luz e à temperatura de aproximadamente 4 °C. Sendo a matriz encapsulante usada insolúvel em água fria, a reidratação poderá não terá sido eficaz, no entanto, ela consegue absorver a água, expandindo-se, o que, em conjunto com a homogeneização no ultraturrax, poderá ter facilitado a libertação de alguns compostos como é o caso dos compostos fenólicos e das betalaínas dos extratos microencapsulados dos figos-da-índia. Outra explicação poderá ser o facto de o método de *Folin-Ciocalteu* carecer de especificidade uma vez que açúcares e ácido ascórbico são considerados compostos interferentes quando presentes em grandes quantidades (Angelo & Jorge, 2007; Semedo, 2012). No caso do extrato do figo *O. robusta* observou-se uma ligeira diminuição de 15,3 % obtendo-se um teor de 58,56 mg AG/g de MS.

Na figura 26 são apresentadas as imagens dos extratos de beterraba e dos figos-da-índia microencapsulados, obtidas pela análise SEM, onde é possível observar a sua morfologia, verificando-se que se obtiveram partículas com uma estrutura amorfa e de diferentes tamanhos.

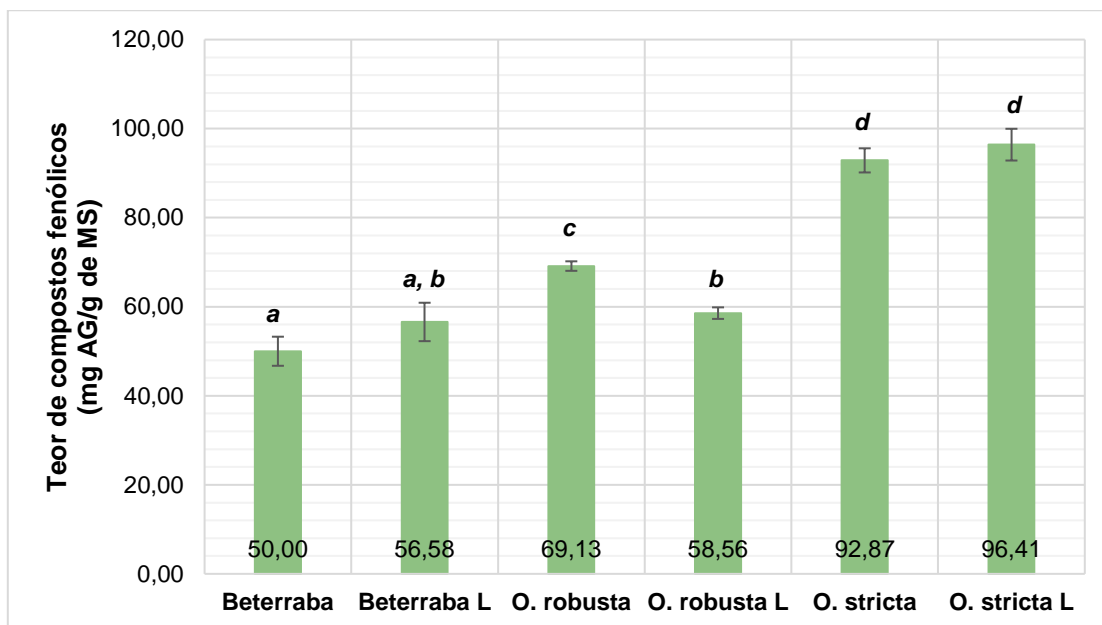


Figura 25 – Teor de compostos fenólicos nos extratos de beterraba vermelha e dos figos-da-índia *Opuntia stricta* e *Opuntia robusta* antes e depois de microencapsulados por liofilização (L). Valores médios \pm desvio-padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os valores médios ($p < 0,05$)

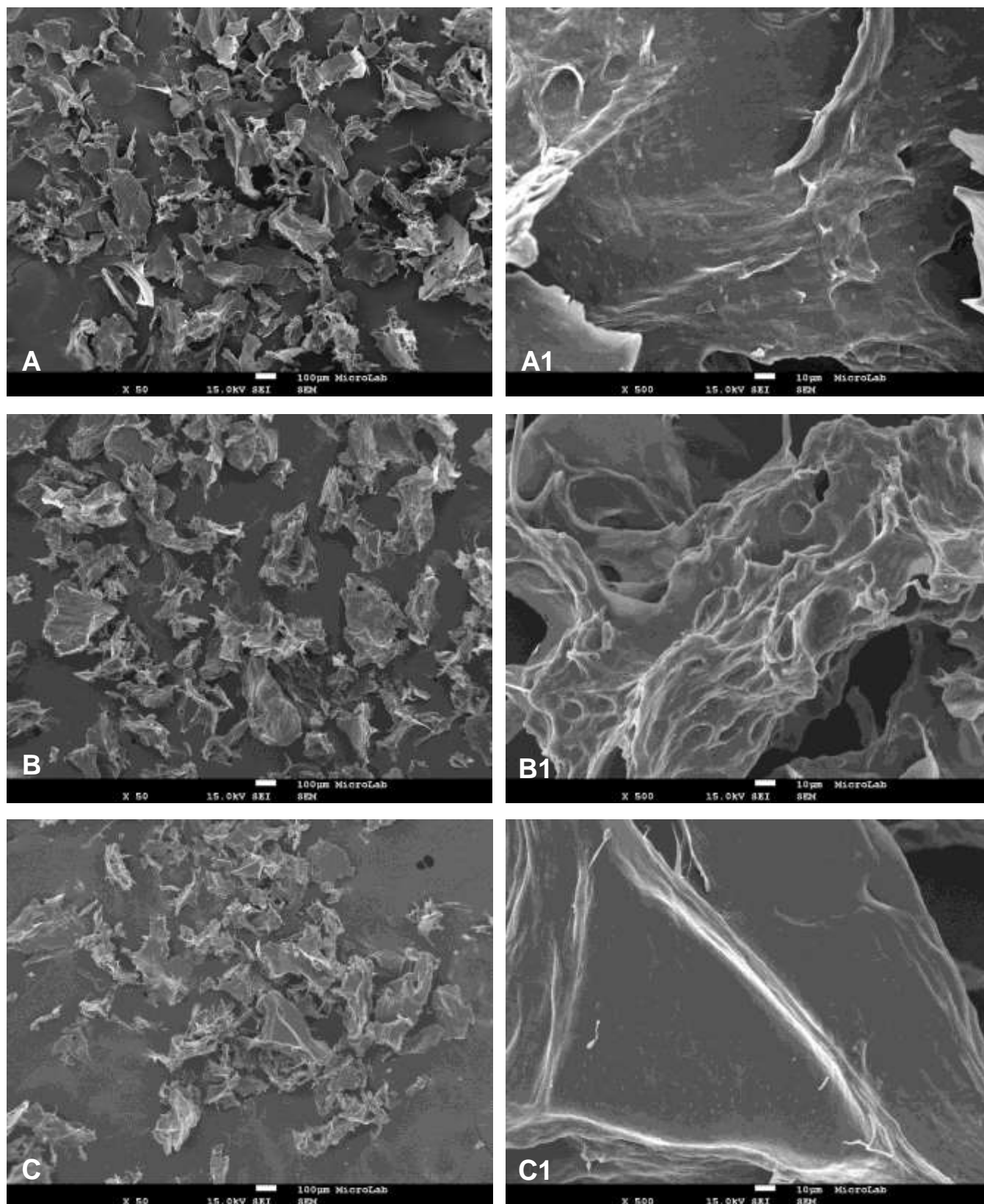


Figura 26 – Imagens obtidas por SEM das microcápsulas dos extratos de beterraba vermelha e dos figos-da-índia *Opuntia stricta* e *Opuntia robusta* obtidas por liofilização

Legenda: A – extrato de beterraba vermelha microencapsulado por liofilização (x 50); A1 – extrato de beterraba vermelha microencapsulado por liofilização (x 500); B – extrato de figo *Opuntia robusta*

microencapsulado por liofilização (x 50); B1 – extrato de figo *Opuntia robusta* microencapsulado por liofilização (x 500); C – extrato de figo *Opuntia stricta* microencapsulado por liofilização (x 50); C1 – extrato de figo *Opuntia stricta* microencapsulado por liofilização (x 500)

Caracterização do extrato de beterraba microencapsulado pelos métodos de spray-dryer e liofilização

Para o extrato de beterraba vermelha realizou-se também o microencapsulamento por *spray-dryer*, com o objetivo de comparar este método com a liofilização e perceber que influências possam ter nos resultados.

Na figura 27 são apresentados os resultados do teor de betalaínas obtidos da caracterização do extrato antes e depois de microencapsulado pelos dois métodos, sendo possível constatar que com o método de *spray-dryer* ocorre um ligeiro aumento (cerca de 18,4 %) no teor de betalaínas totais, obtendo-se um teor de 10,60 mg/g de MS, dos quais 6,06 mg correspondem a betacianinas e os restantes 4,54 mg, a betaxantinas. Com o método de liofilização verifica-se uma diminuição de aproximadamente 47 % obtendo-se um teor de betalaínas totais de 4,75 mg/g de p.s. dos quais 4,16 mg correspondem a betacianinas e 0,59 mg a betaxantinas.

Tendo em conta os métodos usados, seria de esperar que se obtivessem melhores resultados pelo método de liofilização uma vez que este utiliza baixas temperaturas, ao contrário do método por *spray-dryer*, sendo indicado para compostos termossensíveis. Cai & Corke (2000) verificaram que no encapsulamento de extrato de amarantho por *spray-dryer* ocorreu degradação de betacianinas comparativamente com o encapsulamento por liofilização. Também num estudo de Ravichandran *et al.* (2014) a encapsulação de extrato de beterraba por liofilização demonstrou maior recuperação de betalaínas que a encapsulação por *spray-drying*. No entanto, e como já foi referido, a reidratação dos microencapsulados poderá não ter sido eficaz, o que poderá explicar os resultados obtidos.

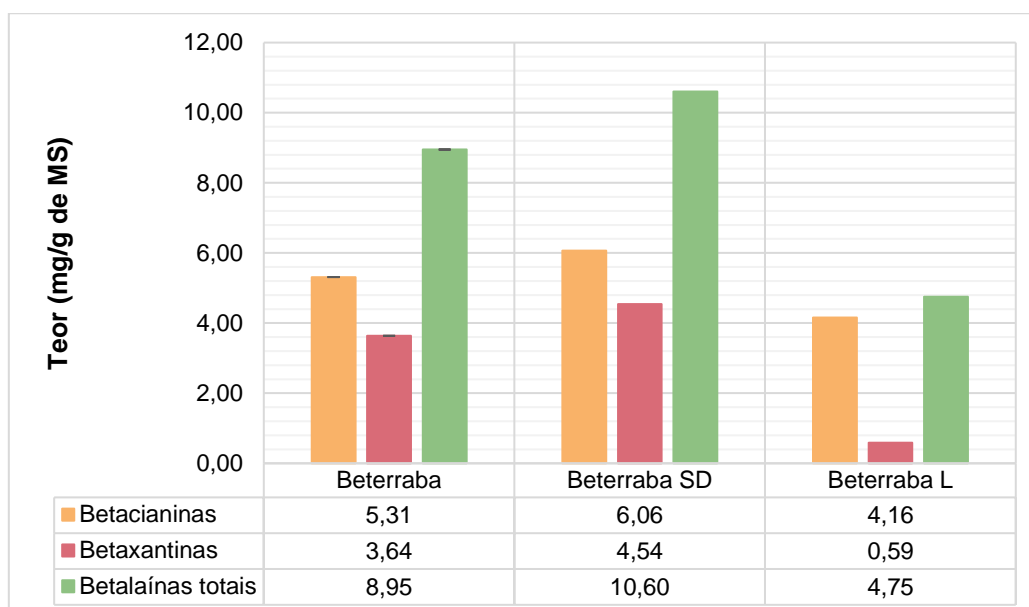


Figura 27 – Teor de betalaínas no extrato de beterraba vermelha antes e depois de microencapsulado pelos métodos de *spray-dryer* (SD) e liofilização (L)

Relativamente à atividade antioxidante determinada pelo método DPPH (figura 28), e para os dois métodos de microencapsulação, observa-se um aumento dos valores EC_{50} em 360 % para o extrato microencapsulado por *spray-dryer* e em 531 % para o microencapsulado por liofilização comparativamente com o extrato de beterraba antes da microencapsulação. O extrato microencapsulado por *spray-dryer* apresenta maior atividade antioxidante (48,35 mg/mL) que o microencapsulado por liofilização (66,28 mg/mL), no entanto verifica-se que de um modo geral ocorre uma perda da atividade antioxidante com a microencapsulação. Quando comparando os resultados do método DPPH com os obtidos pelo método de FRAP (figura 29) verifica-se o contrário, sendo o extrato microencapsulado por liofilização o que apresenta maior atividade antioxidante.

No que respeita ao teor de compostos fenólicos (figura 30) observa-se um aumento de 170 % no microencapsulamento por *spray-dryer* comparativamente com o extrato antes da microencapsulação, enquanto que no microencapsulamento por liofilização houve um pequeno aumento de 13 %, não havendo diferenças significativas entre os teores de compostos fenólicos antes e depois da microencapsulação por liofilização. Tendo em conta que a atividade antioxidante do extrato de beterraba sofre uma diminuição com a microencapsulação, seria de esperar que o teor de compostos fenólicos também diminuísse, o que não se verificou.

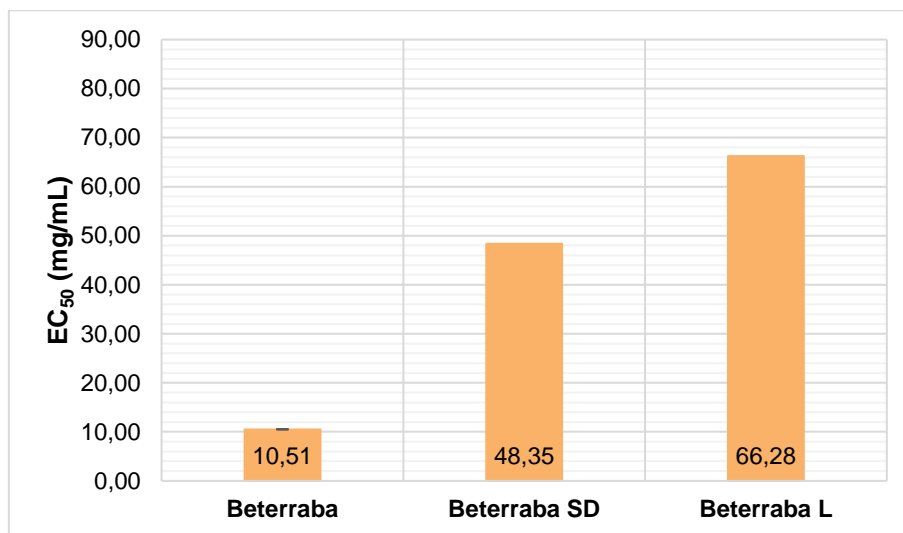


Figura 28 – Atividade antioxidante (método DPPH) do extrato de beterraba vermelha antes e depois de microencapsulado por *spray-dryer* (SD) e liofilização (L)

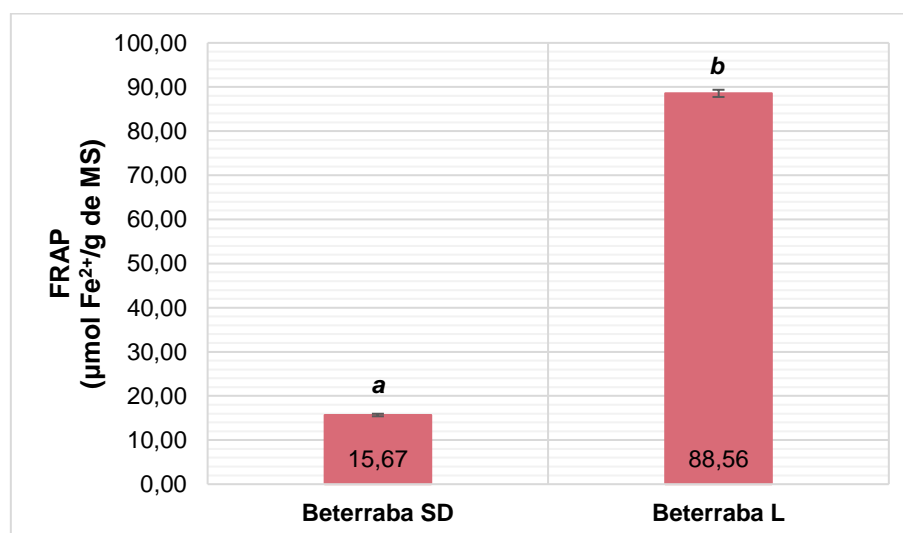


Figura 29 - Atividade antioxidante (método FRAP) do extrato de beterraba vermelha microencapsulado por *spray-dryer* (SD) e liofilização (L). Valores médios ± desvio-padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os valores médios ($p < 0,05$)

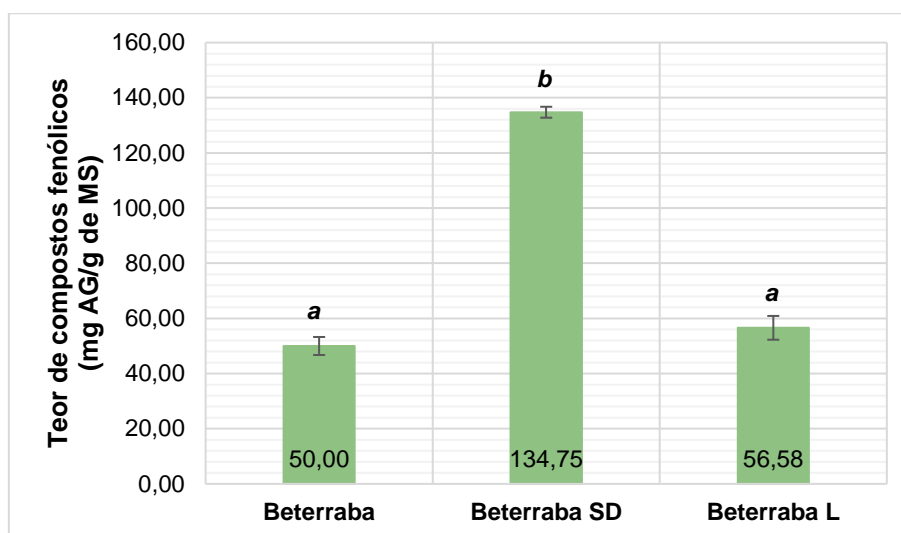


Figura 30 – Teor de compostos fenólicos nos extratos de beterraba vermelha secos e microencapsulados por *spray-dryer* (SD) e liofilização (L). Valores médios \pm desvio-padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os valores médios ($p < 0,05$)

Na figura 31 estão apresentadas as imagens obtidas na análise SEM do extrato de beterraba microencapsulado pelos dois métodos sendo possível observar as diferenças na morfologia dos microencapsulados. Ao contrário do método de liofilização, na microencapsulação pelo método de *spray-dryer* obtiveram-se partículas com uma morfologia esférica, como era de esperar, sendo que se apresentam muito agregadas, o que poderá ser consequência da matriz usada. Castro-Muñoz *et al.* (2015) realizaram a encapsulação de sumo clarificado de figo-da-índia *Opuntia stricta* utilizando como matriz encapsulante uma mistura de gelatina-maltodextrina, e verificaram que as partículas obtidas apresentavam uma distribuição aglomerada, tendo associado este facto às altas concentrações de gelatina nas misturas.

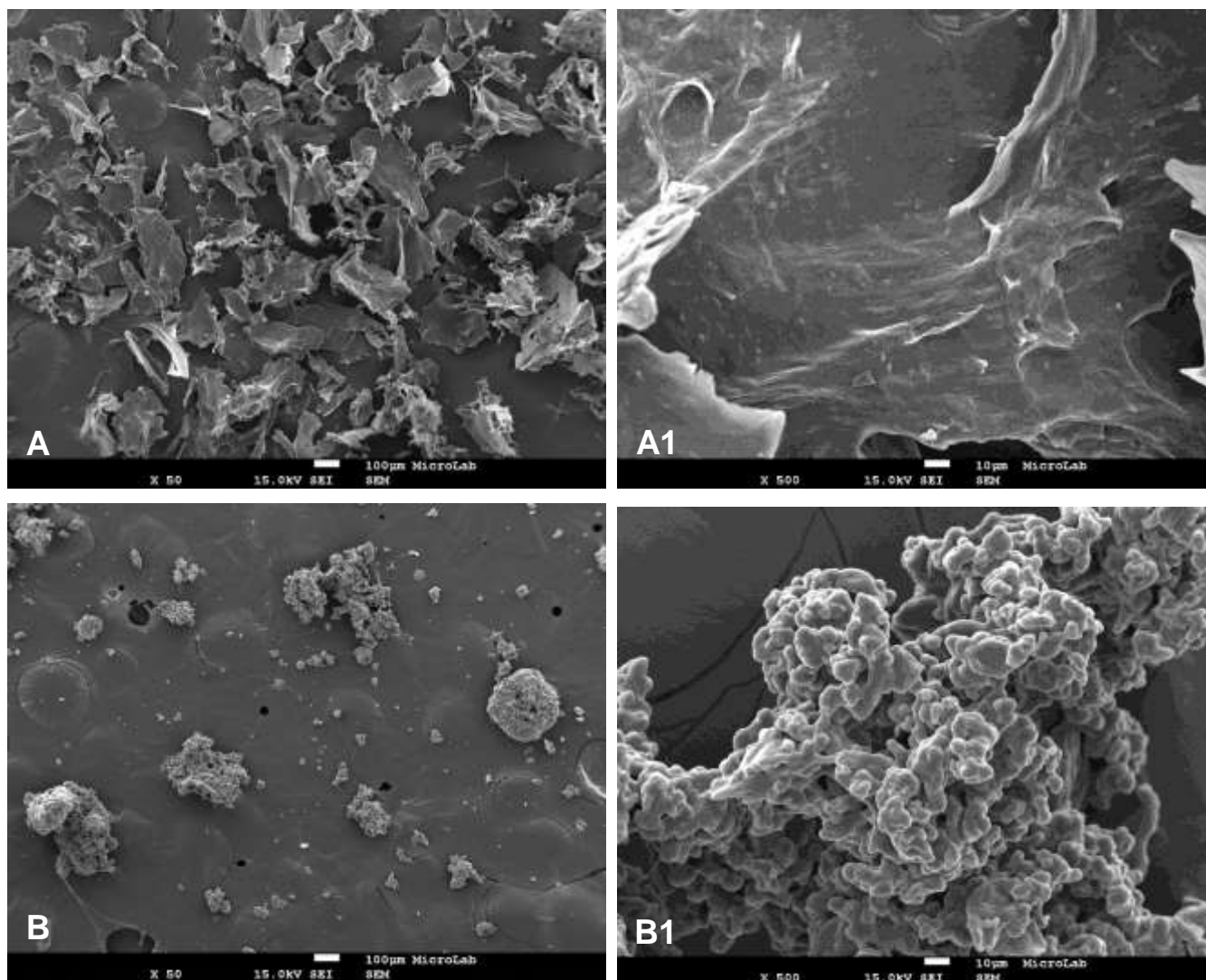


Figura 31 – Imagens obtidas por SEM das microcápsulas de extrato de beterraba vermelha obtidos por liofilização e *spray-dryer*. Legenda: A – extrato de beterraba microencapsulado por liofilização (x 50); A1 – extrato de beterraba microencapsulado por liofilização (x 500); B – extrato de beterraba microencapsulado por *spray-dryer* (x 50); B1 – extrato de beterraba microencapsulado por *spray-dryer* (x 500)

5. CONCLUSÕES

Este trabalho consistiu no encapsulamento do corante extraído das espécies de figo-da-índia *Opuntia stricta* e *Opuntia robusta* tendo-se procedido à caracterização funcional do mesmo antes e depois de encapsulado. O corante natural em estudo consistiu nas betalaínas, compostos que se encontram também presentes na beterraba vermelha sendo esta a matéria-prima principal para a sua obtenção, tendo sido por isso usada neste trabalho como termo de comparação.

Os estudos de termo e foto estabilidade realizados permitiram concluir que as betalaínas são sensíveis aos factores temperatura e luz. Nos testes de termoestabilidade, as betalaínas degradaram-se a partir de 75 °C durante 60 minutos sendo que a cor dos extratos também foi influenciada, à exceção da cor do extrato de beterraba que se revelou mais estável. Nos estudos de fotoestabilidade também se verificou uma diminuição no teor de betalaínas e uma alteração da cor dos extratos com o aumento do número de dias de exposição à luz. O extrato do figo *O. stricta* apresentou um tempo de meia vida superior ($t_{1/2} = 13$ dias) aos extratos de *O. robusta* ($t_{1/2} = 11$ dias) e de beterraba ($t_{1/2} = 3$ dias), revelando uma maior estabilidade à luz. Com estes estudos considerou-se viável o encapsulamento do corante tendo em vista o aumento da sua estabilidade.

Da caracterização dos extratos secos das matérias-primas concluiu-se que os extratos dos figos-da-índia apresentaram teores de betalaínas totais significativamente semelhantes sendo no entanto inferiores ao do extrato de beterraba. O extrato do figo-da-índia *O. stricta* apresenta maior atividade antioxidante que o do *O. robusta*, e ambos apresentam um teor de compostos fenólicos maior que o extrato de beterraba, apresentando uma vantagem nutricional sobre esta.

O encapsulamento dos extratos foi realizado pelo método de liofilização tendo-se usado o agar-agar como matriz encapsulante. Com o encapsulamento verificou-se uma diminuição da atividade antioxidante dos extratos e do teor de betalaínas do extrato de beterraba, o que poderá estar relacionado com a reidratação dos microencapsulados que não terá sido a mais eficaz, pelo que seria interessante, num trabalho futuro, testar diferentes métodos de reidratação.

No caso do encapsulamento do extrato de beterraba através dos métodos de *spray-dryer* e de liofilização, obtiveram-se melhores resultados com o primeiro método apesar de se verificar uma redução dos valores comparativamente com o extrato antes da microencapsulação. Com este trabalho pode-se concluir que o agar-agar não aparenta ser uma boa opção de matriz encapsulante pelo método de liofilização, uma vez que as estruturas obtidas apresentam uma

morfologia amorfa e não esférica, ao contrário do encapsulamento por *spray-dryer*. Os resultados obtidos permitem concluir que os dois métodos apresentam vantagens e desvantagens que interessam estudar no futuro. As vantagens do encapsulamento de *spray-dryer* sobre a liofilização são ser um método simples, rápido e económico. No entanto, estudos de estabilidade dos diferentes extratos de beterraba e figo da Índia microencapsulados por *spray-dryer* e por liofilização deverão ser realizados de modo a avaliar se o agar-agar como matriz encapsulante dos corantes betalaínas é eficaz. Para além disso, o rendimento do encapsulamento através dos dois processos também poderá contribuir para indicação sobre o processo mais vantajoso de encapsulamento dos corantes de betalaínas.

Sendo o objetivo deste trabalho procurar fontes alternativas à beterraba vermelha para obtenção de corante alimentar, o uso dos figos-da-Índia aparenta ser uma boa opção, não só pela variedade de cores como também pela presença de compostos fenólicos que possam ser benéficos para aumentar a estabilidade dos microencapsulados.

BIBLIOGRAFIA

- ALVES, J. C.; MOTA, M.; OLIVEIRA, C. M. A figueira-da-índia. *Pequenos Frutos*. Vol. 5, **2013**, 14-17 p.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. Revista do Instituto Adolfo Lutz. Vol. 66, nº 1, **2007**, 1-9 p.
- AZEREDO, H. M. C. Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. International Journal of Food Science and Technology. Vol. 44, **2009**, 2365-2376 p.
- AZEREDO, H. M. C.; SANTOS, A. N.; SOUZA, A. C. R.; MENDES, K. C. B.; ANDRADE, M. I. R. Betacyanin stability during processing and storage of a microencapsulated red beetroot extract. American Journal of Food and Technology. Vol. 2, nº 4, **2007**, 307-312 p.
- BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. Food Chemistry. 4^a ed. Berlim: Springer, **2009**. 1070 p.
- BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J., The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as measurement of 'antioxidant power': The FRAP assay. Analytical Biochemistry. Vol. 239, **1996**, 70–76 p.
- CAI, Y. Z.; CORKE, H. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. Journal of Food Science. Vol. 65, nº 6, **2000**, 1248-1252 p.
- CAI, Y.; SUN, M.; CORKE, H. Colorant properties and stability of *amaranthus* betacyanin pigments. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 46, **1998**, 4491-4495 p.
- CARDOSO, A.S. Corantes e Pigmentos. In: GOMES DE CASTRO, A. A Química e a Reologia no Processamento dos Alimentos. Lisboa: Instituto PIAGET, **2003**. Cap.10, 241-248 p.
- ČANADANOVIĆ-BRUNET, J. M.; SAVATOVIĆ, S. S.; ĆETKOVIĆ, G. S.; VULIĆ, J. J.; DJILAS, S. M.; MARKOV, S. L.; CVETKOVIĆ, D. D. Antioxidant and antimicrobial activities of beet root pomace extracts. Czech Journal of Food Sciences. Vol. 29, nº 6, **2011**, 575-585 p.
- CASTELLAR, R.; OBÓN, J. M.; ALACID, M.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. A. Color Properties and Stability of Betacyanins from *Opuntia* Fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol.51, **2003**, 2772-2776 p.
- CASTELLANOS-SANTIAGO, E.; YAHIA, E. Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrimetry. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol.56, **2008**, 5758-5764 p.

CASTRO-MUÑOZ, R.; BARRAGÁN-HUERTA, B. E.; YÁÑEZ-FERNÁNDEZ, J. Use of gelatin-maltodextrin composite as an encapsulation support for clarified juice from purple cactus pear (*Opuntia stricta*). LWT – Food Science and Technology. Vol.62, **2015**, 242-248 p.

CHRANIOTI, C.; NIKOLOUDAKI, A.; TZIA, C. Saffron and beetroot extracts encapsulated in maltodextrin, gum Arabic, modified starch and chitosan: incorporation in a chewing gum system. Carbohydrate Polymers. Vol. 127, **2015**, 252-263 p.

COSTA, S. S.; MACHADO, B. A. S.; MARTIN, A. R.; BAGNARA, F.; RAGADALLI, S. A.; ALVEZ, A. R. C. Drying by spray drying in the food industry: micro-encapsulation, process parameters and main carriers used. African Journal of Food Science. Vol. 9, nº9, **2015**, 462-470 p.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. Vol. 40, nº 3, **2000**, 173-289 p.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. International Journal of Food and Technology. Vol. 35, nº 1, **2000**, 5-22 p.

FAO. 2013. Agro-industrial utilization of cactus pear. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/019/a0534e/a0534e.pdf>. Acesso em: 26/3/2016.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. A.; ALMELA, L.; OBÓN, J. M.; CASTELLAR, R. Determination of antioxidante constituents in cactus pear fruits. Plant Foods for Human Nutrition. Vol. 65, **2010**, 253-259 p.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. A.; ANGOSTO, J. M.; GIMÉNEZ, P. J.; LEÓN, G. Thermal stability of selected natural red extracts used as food colorants. Plant Foods for Human Nutrition. Vol.68, **2013**, 11-17 p.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. A.; CASTELLAR, R.; OBÓN, J. M.; ALMELA, L. Screening and mass-spectral confirmation of betalains in cactus pears. Chromatographia. Vol. 56, **2002**, 591-595 p.

FERREIRA, A.; CANDEIAS, D.; COELHO, I. S.; PASSARINHO, J. A.; ALVES, J. C. R.; ANDRADA, L. C.; FERREIRA, M. E.; OLIVEIRA, M. M. R.; SAPATA, M. M. L.; RAMOS, P. J. T.; REIS, P. A cultura da figueira-da-índia e a valorização agroindustrial do fruto. 1ª ed. Oeiras: INIAV, I.P., 2016. 101 p.

FRANCIS, F. J. — Colorants. Minnesota: American Association of Cereal Chemists, **1999**. 144 p.

GANDÍA-HERRERO, F.; JIMÉNEZ-ATIÉNZAR, M.; CABANES, J.; GARCÍA-CARMONA, F.; ESCRIBANO, J. Stabilization of the bioactive pigment of *Opuntia* fruits through maltodextrin encapsulation. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 58, **2010**, 10646-10652 p.

GASZTONYI, M. N.; DAOOD, H.; HÁJOS, M. T.; BIACS, P. Comparison of red beet (*Beta vulgaris* var. *conditiva*) varieties on the basis of their pigment components. Journal of the Science of Food and Agriculture. Vol. 83, **2001**, 932-933 p.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulatin of food ingredientes: na overview. Food Research International. Vol. 40, **2007**, 1107-1121 p.

HAI KOUBAIER, H. B.; SNOUSSI, A.; ESSAIDI, I.; CHAABOUNI, M. M.; THONART, P.; BOUZOUITA, N. Betalain and phenolic compositions, antioxidant activity of Tunisian red beet (*Beta vulgaris* L. *conditiva*) root and stems extracts. International Journal of Food Properties. Vol. 17, **2014**, 1934-1945 p.

HERBACH, K. M.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. Betalain Stability and Degradation – Structural and Chromatic Aspects. Journal of Food Science. Vol. 71, nº 4, **2006**, 41-50 p.

HERNANDES, N. K.; CONEGLIAN, R. C. C.; GODOY, R. L. O.; VITAL, H. C.; JUNIOR, M. F. Testes sensoriais de aceitação da beterraba vermelha (*Beta vulgaris* spp. *vulgaris* L.), cv. Early Wonder, minimamente processada e irradiada. Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Vol. 27, **2007**, 64-68 p.

IMESON, A. Agar. In: IMESON, A. – Food stabilizers, thickeners and gelling agents. Oxford: Wiley-Blackwell, **2010**. 31-47 p.

JANISZEWSKA, E. Mircroencapsulated beetroot juice as a potencial source of betalain. Powder Technology. Vol. 264, **2014**, 190-196 p.

KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J.; RAUHA, J-P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T. S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 47, **1999**, 3954-3962 p.

KAIMAINEN, M. Stability of Natural Colorants of Plant Origin. Turku: Universidade de Turku, **2014**. 93 p. Tese de doutoramento em Ciências dos Alimentos.

KANDANSAMY, K.; SOMASUNDARAM, P. D.; Microencapsulation of colors by spray drying – A review. International Journal of Food Engineering. Vol. 8, nº 2, **2012**, Artigo 1.

KHAN, M.I. Stabilization of betalains: A review. Food Chemistry. Vol. 197, **2016**, 1280-1285 p.

KUJANA, T. S.; VIENOLA, M. S.; KLIKA, K. D.; LOPONEN, J. M.; PIHLAJA, K. Betalain and phenolics compositions of four beetroot (*Beta vulgaris*) cultivars. European Food Research and Technology. Vol. 214, **2002**, 505-510 p.

LANGE, W.; BRANDENBURG, W. A.; DE BOCK, T. S. M. Taxonomy and cultonomy of beet (*Beta vulgaris* L.). Botanical Journal of the Linnean Society. Vol. 130, **1999**, 81-96 p.

LIDON, F.; SILVESTRE, M. M. – Princípios de Alimentação e Nutrição Humana. Lisboa: Escolar Editora, **2010**. 647 p.

LIDON, F.J.C.; SILVESTRE, M.M. Indústrias Alimentares. Aditivos e Tecnologia. Lisboa: Escolar Editora, **2007**. 379 p.

LORENTZEN, J. Freeze drying: the process, equipment and products. In: THORNE, S. – Developments in Food Preservation. Essex: Applied Science Publishers Ltd., **1981**. Cap. 5, 153-175 p.

OTÁLORA, M. C.; CARRIAZO, J. C.; ITURRIAGA, L.; NAZARENO, M. A.; OSORIO, C. microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (*Opuntia ficus-indica*) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents. Food Chemistry. Vol. 187, **2015**, 174-181 p.

ÖZKAN, G.; BILEK, S.E. Microencapsulation of natural food colourants. International Journal of Nutrition and Food Sciences. Vol. 3, nº 3, **2014**, 145-156.

PINEDO-ESPINOZA, J. M.; AGUIRRE-MANCILLA, C. L.; JIMÉNEZ-ALVARADO, R.; RAYA-PÉREZ, J. C.; ITURRIAGA, G.; RAMÍREZ-PIMENTEL, J. G.; HERNÁNDEZ-FUENTES, A. D. Bioactive compounds and antioxidant activity evolution during ripening process of 12 *Opuntia* spp. Fruit accessions. Emirates Journal of Food and Agriculture. Vol. 29, nº 2, **2017**, 138-148 p.

RAVICHANDRAN, K.; SAW, N.M.M.T.; MOHDALY, A.A.A.; GABR, A.M.M.; KASTELL, A.; RIEDEL, H.; CAI, Z.; KNORR, D.; SMETANSKA, I. Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity. Food Research International. Vol. 50, **2013**, 670-675 p.

RAVICHANDRAN, K.; RAVICHANDRAN, P.; SAW, N.M.M.T.; GABR, A.M.M.; AHMED, A.R.; KNORR, D.; SMETANSKA, I. Effects of different encapsulation agentes and drying process on stability of betalains extract. Journal of Food Science Technology. Vol. 51, nº 9, **2014**, 2216-2221 p.

RÉ, M. I. Microencapsulation by spray drying. Drying Technology. Vol. 16, nº 6, **1998**, 1195-1236 p.

ROSÁRIO, L.; SERRANO, C.; MOLDÃO, M.; ESTEVES, P. Extração e termo-estabilidade do corante natural obtido a partir de Figo-da-índia (*Opuntia stricta*). Poster apresentado na 8ª Reunião Anual PortFIR do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal. **2015**

SÁENZ, C. BERGER, H.; CORRALES GARCÍA, J.; GALLETI, L.; CORTÁZAR, V. C.; HIGUERA, I.; MONDRAGÓN, C.; RODRÍGUEZ-FÉLIX, A.; SEPÚLVEDA, E.; VARNERO, M. T. **2006**. Utilización agroindustrial del nopal. 2006. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/009/a0534s/a0534s00.htm>. Acesso em 27/3/2016

SÁENZ, C.; CANCINO, B.; ROBERT, P. Red Betalains from *Opuntia* spp.: Natural colorants with potencial applications in foods. Israel Journal of Plant Sciences. Vol. 60, nº 3, **2012**, 291-299 p.

SAÉNZ, C.; TAPIA, S.; CHÁVEZ, J.; ROBERT, P. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). Food Chemistry. Vol. 114, **2009**, 616-622 p.

SEMEDO, A. C. J. Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica*. Lisboa: Universidade de Lisboa – Faculdade de Farmácia, 2012. 119 p. Tese de mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos.

SHEKHAR, K.; NAGA MADHU, M.; PRADEEP, B.; BANJI, D. A review on microencapsulation. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. Vol. 5, nº 2, **2010**, 58-62 p.

TERRONI, H. C.; DE JESUS, J. M.; ARTUZO, L. T.; VENTURA, L. V.; SANTOS, R. F.; DAMY-BENETTI, P. Liofilização. Disponível em: <http://www.unilago.edu.br/revista/edicaoanterior/Sumario/2013/downloads/2013/LIOFILIZA%C3%87%C3%83O.pdf>. Acesso em: 31/5/2016.

VERGARA, C.; SAAVEDRA, J.; SÁENZ, C.; GARCÍA, P.; ROBERT, P. Microencapsulation of pulp and ultrafiltered cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) extracts and betanin stability during storage. Food Chemistry. Vol. 157, **2014**, 246-251 p.

YAHIA, E. M.; MONDRAGON-JACOBO, C. Nutricional componentes and anti-oxidant capacity of tem cultivars and lines of cactus pear (*Opuntia* spp.). Food Research International. Vol. 44, **2011**, 2311-2318 p.

YEDDES, N.; CHÉRIF, J. K.; GUYOT, S.; SOTIN, H.; AYADI, M. T. Comparative study of antioxidant power, polyphenols, flavonoids and betacyanins of the peel and pulp of three Tunisian *Opuntia* forms. Antioxidants. Vol. 2, **2013**, 37-51 p.

ZUIDAM, N. J.; SHIMONI, E. Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to make them. In: ZUIDAM, N. J.; NEDOVIC, V. – Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. Nova York: Springer, **2010**.
Cáp. 2, 3-29 p.

ANEXOS

ANEXO I – Preparação da curva de calibração para a determinação do teor de compostos fenólicos pelo método de *Folin-Ciocalteu*

Para a realização da curva de calibração, preparou-se, em triplicado, sete soluções conforme indicado na tabela 7, tendo-se usado o reagente de *Folin-Ciocalteu* (Merck), uma solução de Na₂CO₃ (Hopkin & Williams) a 20 % e uma solução de ácido gálico (Merck) com uma concentração de 2,5 mg/mL.

Tabela 7 – Modo de preparação das soluções para a curva de calibração do método *Folin-Ciocalteu*

Solução	Concentração (g/L)	Ácido gálico (mL)	Água destilada (mL)	Reagente de <i>Folin-Ciocalteu</i> (mL)	Solução Na ₂ CO ₃ (mL)
1	$6,28 \times 10^{-4}$	0,2	7,8	0,5	1,5
2	$9,42 \times 10^{-4}$	0,5	7,5	0,5	1,5
3	$12,56 \times 10^{-4}$	1,0	7,0	0,5	1,5
4	$1,57 \times 10^{-3}$	1,5	6,5	0,5	1,5
5	$18,84 \times 10^{-4}$	2,0	6,0	0,5	1,5
6	$21,98 \times 10^{-4}$	2,5	5,5	0,5	1,5
7	$25,12 \times 10^{-4}$	3,0	5,0	0,5	1,5
8	5×10^{-3}	3,5	4,5	0,5	1,5
9	$7,5 \times 10^{-3}$	4,0	4,0	0,5	1,5
10	$1,25 \times 10^{-2}$	4,5	3,0	0,5	1,5

Após a leitura da absorvância das soluções a 750 nm, construiu-se um gráfico da concentração em função da absorvância, do qual se obteve uma curva com a equação $y = 88,003x + 0,0288$ e um R² de 0,9975 (figura 32).

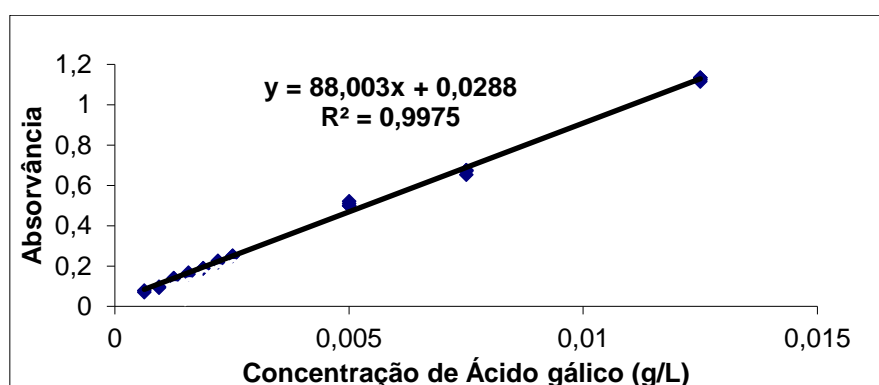


Figura 32 - Curva de calibração do método *Folin-Ciocalteu*

ANEXO II – Modo de preparação das soluções para a determinação da atividade antioxidante pelo método de redução do ião ferro (FRAP)

Para a determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP foi necessário a preparação de 4 soluções.

A solução 1 é uma solução de 300 mmol/L de tampão acetato a pH=3,6. A preparação desta solução consiste em pesar 3,1 g de acetato de sódio $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$ (Merck) e dissolver em 1000 mL de água destilada e acertando-se o pH até atingir o valor de 3,6.

A solução 2 consiste em pipetar 16 mL de ácido acético (Panreac) para um balão de 1000 mL e perfazer com a solução 1.

A solução 3 é uma solução de 10 mmol/L de TPTZ. Para a sua preparação, prepara-se uma solução acidificada de 40 mmol HCl, medindo 0,4 mL de HCl concentrado (Merck) para um balão de 100 mL, perfazendo o volume com água destilada. Pesa-se 0,3123 g de TPTZ (Sigma) e dissolve-se para um balão de 100 mL com a solução acidificada.

A solução 4 é uma solução de 20 mmol/L de cloreto de ferro ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$). Esta solução é preparada pesando 0,135 g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Merck) e dissolvendo em balão de 25 mL com água destilada.

A solução FRAP é preparada adicionando 2,5 mL da solução 3, 2,5 mL da solução 4 e 25 mL da solução 2.

ANEXO III – Preparação da curva de calibração para a determinação da atividade antioxidante pelo método de redução do ião ferro (FRAP)

Para a realização da curva de calibração, preparou-se uma solução-mãe de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ com concentração de 1000 $\mu\text{mol/L}$ (pesou-se 0,27802 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck) e dissolveu-se em balão de 1000 mL com água destilada). A partir desta solução prepararam-se, em triplicado, 7 soluções em balões de 10 mL, conforme indicado na tabela 8. A preparação dos tubos para a leitura das absorvâncias consistiu em colocar 0,2 mL de cada diluição em cada tubo e adicionar 1,8 mL de solução FRAP. Foi necessário corrigir a concentração de cada diluição para o volume final de 2 mL (0,2 + 1,8 mL). Agitou-se cada tubo no vortex e colocou-se no escuro durante 5 minutos.

Tabela 8 – Modo de preparação das soluções para a curva de calibração do método de redução do ião ferro (FRAP)

Solução	Volume de solução-mãe $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (mL)	Concentração ($\mu\text{mol/mL}$)	Concentração corrigida ($\mu\text{mol/L}$)
1	0,125	0,0125	1,25
2	0,5	0,5	5
3	1	1	10
4	2	2	20
5	3	3	30
6	4	4	40
7	5	5	50

Após a leitura da absorvância das soluções a 593 nm, construiu-se um gráfico da concentração em função da absorvância, do qual se obteve uma curva com a equação $y = 0,0213x - 0,0057$ e um R^2 de 0,9964 (figura 33).

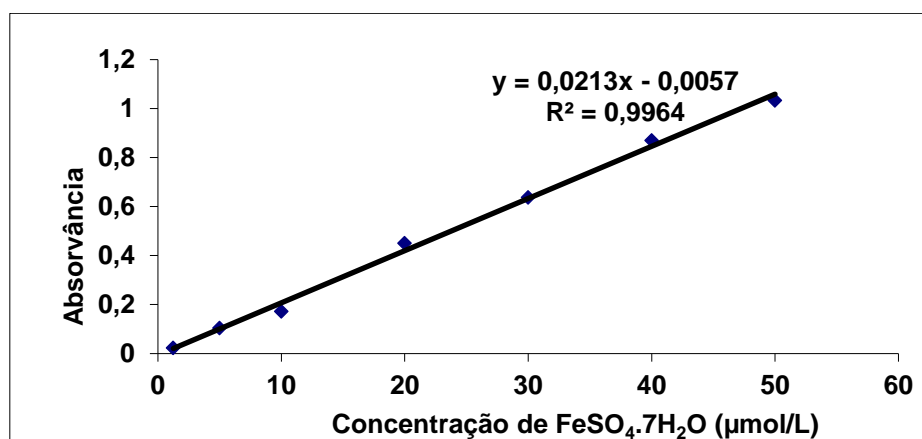


Figura 33 – Curva de calibração do método redução do ião ferro (FRAP)

ANEXO IV – Resultados dos estudos de termoestabilidade dos extratos

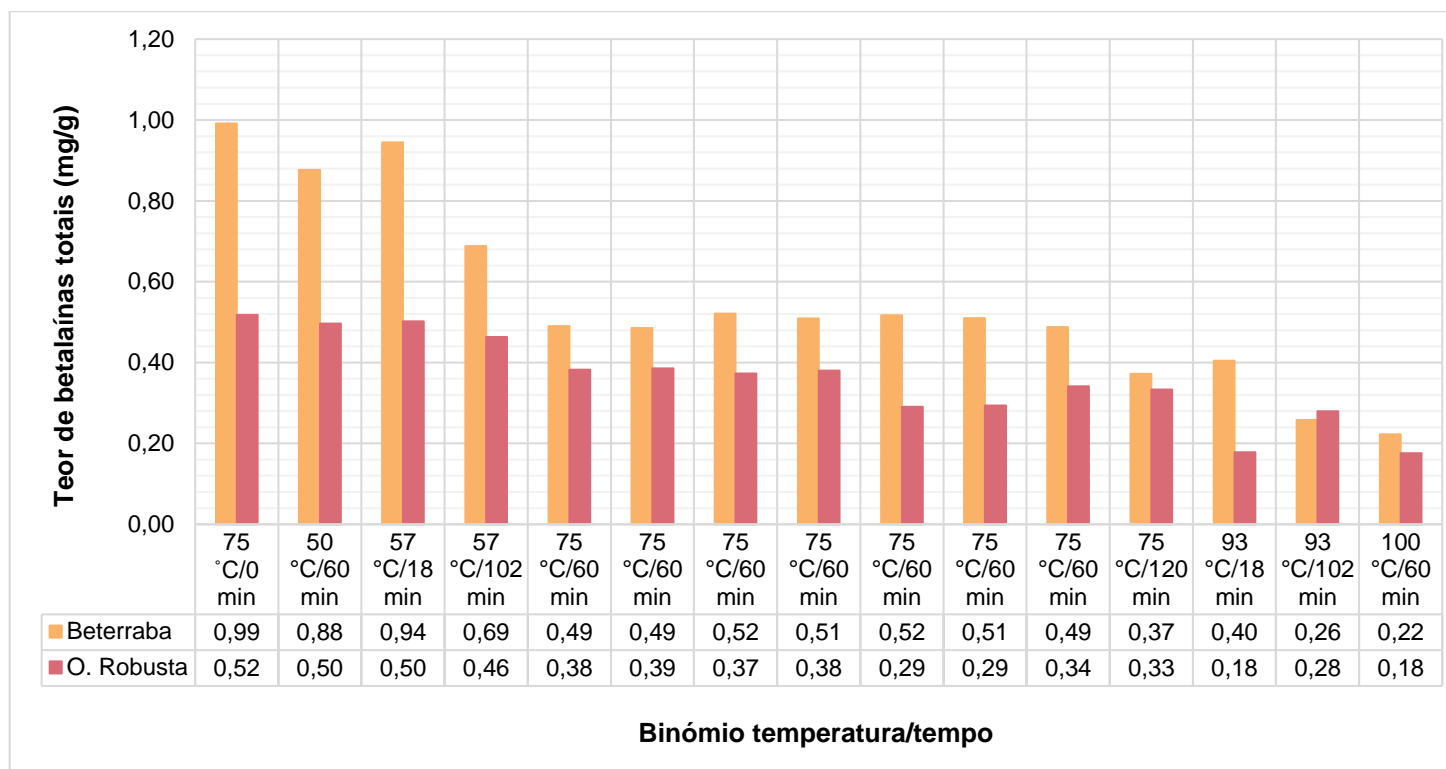


Figura 34 – Teor de betalaínas totais dos extratos de beterraba vermelha e figo-da-índia *Opuntia robusta* nos estudos de termoestabilidade

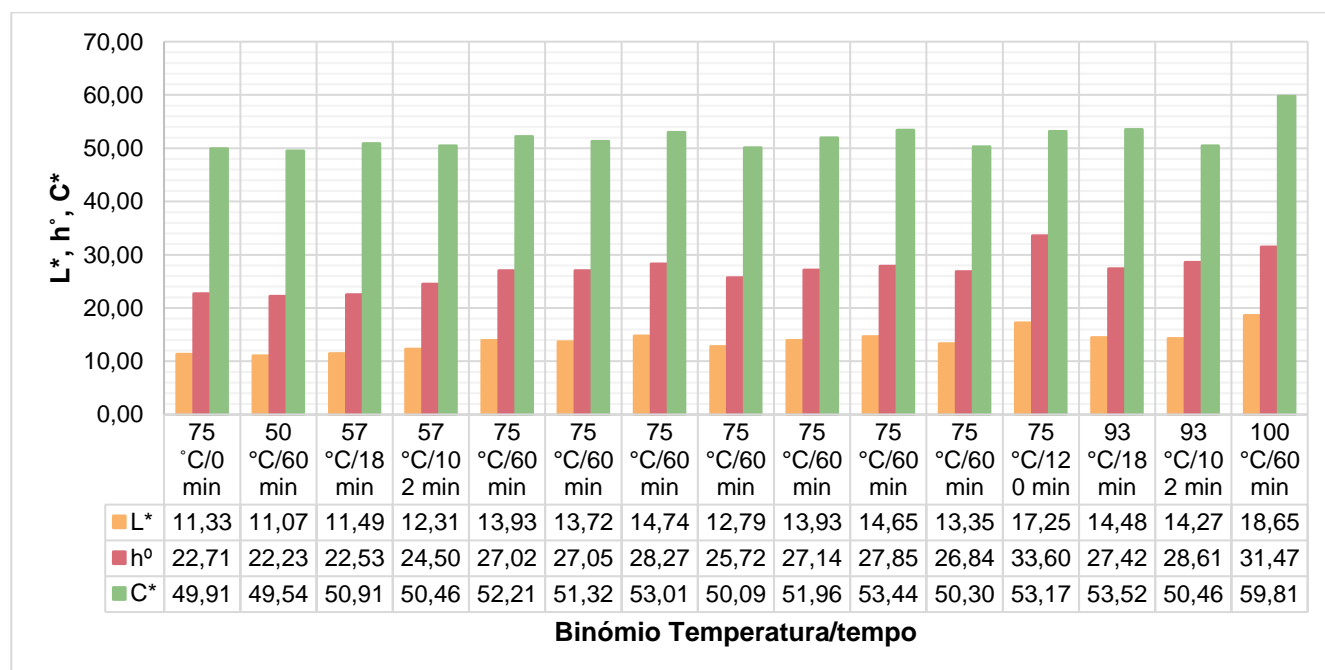


Figura 35 – Análise colorimétrica do extrato de beterraba vermelha nos estudos de termoestabilidade

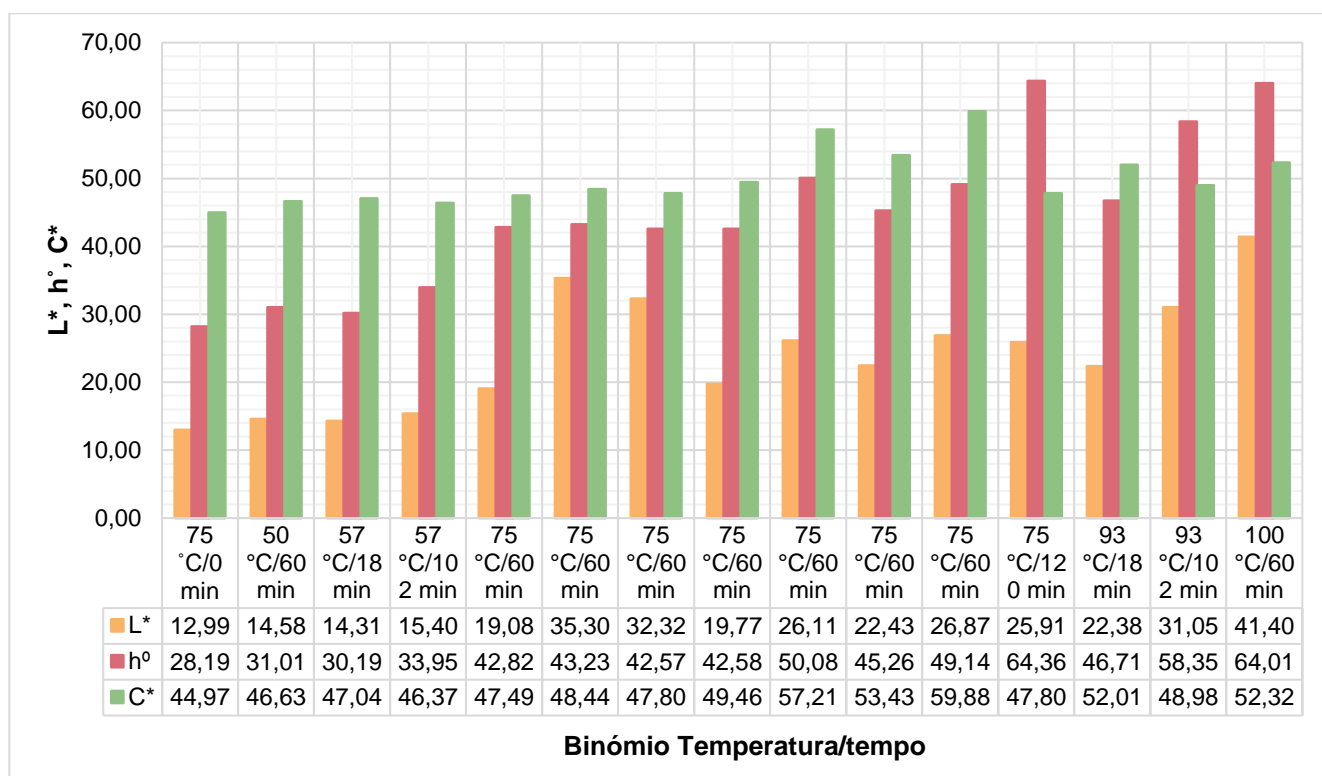


Figura 36 – Análise colorimétrica do extrato de figo-da-índia *Opuntia robusta* nos estudos de termoestabilidade